

Національний технічний університет України «Київський політехнічний
інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Національний технічний університет України «Київський політехнічний
інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Похилько Світлана Юріївна

УДК 601.4:577.21:633.11

Дисертація

**Технологічні аспекти біофортифікації м'якої пшениці геном *Gpc-B1* від
Triticum turgidum ssp. *dicoccoides***

Подается на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за
спеціальністю 03.00.20 - біотехнологія

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело:

_____ С.Ю. Похилько

Науковий керівник: Моргун Богдан Володимирович, кандидат біологічних
наук

Київ - 2018

АНОТАЦІЯ

Похилько С.Ю. Технологічні аспекти біофортифікації м'якої пшениці геном *GPC-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України. – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, Київ, 2018.

Однією з найбільших проблем людства XXI століття – це забезпечення стабільного харчування постійно зростаючого населення земної кулі. Однак, хоча калорійне недоїдання (гострий голод) зменшилося, недоїдання поживних речовин, так званий «прихований голод», викликаний нестачею вітамінів та мінералів збільшився. Дана проблема, актуальна для 2 млрд людей, а отже являє собою найпоширенішу форму недоїдання.

Технології майбутнього сільського господарства будуть направлені на вирішення подвійного завдання: підвищення кількості і якості продуктів для споживання населенням.

Однією із основних продовольчих сільськогосподарських культур світу є пшениця. Вона являється основним джерелом енергії, білка і клітковини у раціоні людини.

Однією із проблем сьогодення України є питання поліпшення якості зерна пшениці. Більша частина пшениці, що вирощується в Україні відноситься до фуражного класу, тобто 5-го, 6-го класу і тільки 40-50% продовольчої пшениці.

Одним із напрямків генетичного поліпшення сортів щодо підвищеного вмісту макро- та мікроелементів, білка є перенесення генів від диких родичів,

таких, наприклад, як спельта, полба. Вони мають більш широке генетичне різноманіття і більш високі концентрації поживних речовин, ніж у сучасних культурних сортах пшениці. Особливий інтерес в цьому напрямку, представляє ген *Gpc-B1*. Наявність гена *Gpc-B1* суттєво збільшує у порівнянні з вихідною лінією вміст в зерні цинку, заліза, марганцю та білка.

Використання сучасних систем ДНК – маркерів, а також новітні методи аналізу якісного складу зерна, дадуть можливість в більш короткий час, відібрати перспективні лінії з підвищеним вмістом мікроелементного складу та білка.

У дисертаційній роботі розроблено технологію відбору зразків популяції пшениці носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Дисертаційну роботу виконано на базі кафедри промислової біотехнології Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» і відділу молекулярної генетики Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України у рамках державної бюджетної теми III-6-16 «Розробка систем генотипування та маркування цінних біологічних ознак сільськогосподарських культур» (державний реєстраційний номер 0116U000173).

У дисертаційній роботі вперше розроблено молекулярно-генетичні системи ДНК – маркерів для визначення наявності гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Вперше було досліджено алельний стан пуроіндолінових генів у дослідних лініях м'якої пшениці носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* та виявлено унікальну комбінацію алелей *Pina-D1b*, *Pinb-D1a*, що не виявлена у вітчизняних сортах пшениці.

За допомогою аналізу алелей генів глютенінів, доведено екстрасильні показники борошна дослідних ліній носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

За результатами аналізу мікро- та макроелементів, аналізу вмісту загального білка, встановлено, що ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в дослідних лініях м'якої пшениці підвищує вміст Fe, Mn, Zn, Se та білка в порівнянні з вихідним сортом Куяльник.

Вперше проаналізовано врожайність та фізіологічні показники дослідних ліній носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в польових умовах.

Вперше розроблено технологію відбору ліній м'якої пшениці носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Отримані результати аналізу поколінь дослідних ліній носії гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* використані в селекційних програмах Інституту фізіології рослин та генетики НАН України, а також в Селекційно-генетичному інституті Національний центр насіннєзнавства і сортовивчення НААН України.

Розроблені молекулярні генетичні системи для визначення гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* можуть бути використанні для контролю гена в подальших селекційних схрещуваннях і направленого відбору необхідних ліній.

Молекулярно - генетичні системи розроблені для визначення частоти рекомбінації локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219* на 6В хромосомі, можуть надалі бути використані для генотипування сортів.

Відібрані лінії пшениці F₆ покоління - носії гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* можуть бути використані для отримання перспективного сорту пшениці з підвищеним вмістом білка та мікро- та макроелементів.

Результати досліджень, представлені в дисертаційній роботі, одержано особисто автором. Наведені в рукописі результати отримано здобувачем особисто або за безпосередньої участі при виконанні експериментів. Автором особисто відібрана та проаналізована сучасна вітчизняна і закордонна наукова література за темою дослідження дисертаційної роботи.

Концепцію роботи, планування і методологію експериментальних досліджень, основні результати і висновки роботи сформульовані та обговорені дисертантом разом з науковим керівником: к.б.н. Моргуном Б.В.

Автором особисто здійснено виділення рослинної ДНК; підібрано біотехнологічні підходи для виявлення поліморфізму цільових генів; розроблено і проведено уніплексні та мультиплексні ПЛР з різними праймерами; проведено відбір зразків для визначення вмісту мікро- та макроелементів; проведено визначення якісних показників пшениці метод інфрачервоної спектроскопії; проведено визначення загального азоту методом К'ельдаля; проведено польові роботи.

Робота є результатом самостійних досліджень С.Ю. Похилько.

За результатами досліджень опубліковано 15 наукових праць, у тому числі 5 статей у наукових фахових виданнях України (з них 2 статті у виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз), 10 тез доповідей у збірниках матеріалів конференцій.

Ключові слова: ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, м'яка пшениця, молекулярні маркери, біофортифікація, вміст білка та мікро- та макроелементів.

SUMMARY

Pokhylko S.Yu. Technological aspects of bread wheat biofortification of *Gpc-B1* gene from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* - Qualification scientific work manuscript copyright.

Thesis for the candidate degree in biological sciences, specialty 03.00.20 - biotechnology. - National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute», Ministry of Education and Science of Ukraine. - Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine. - National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute», Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

One of the greatest problems of the humanity of the XXI century - is to ensure a stable supply of the ever-growing population of the globe. However, although calorie malnutrition (acute famine) has decreased, malnutrition of nutrients, the so-called "hidden famine", caused by a shortage of vitamins and minerals, has increased. This problem is relevant to 2 billion people, and therefore represents the most common form of malnutrition.

Technologies of the future of agriculture will be aimed at solving a dual task: increasing the quantity and quality of products for consumption by the population.

One of the main food crops in the world is wheat. It is the main source of energy, protein, and fiber in the human diet.

One of the problems of the present day of Ukraine is the question of improving the quality of wheat grain. Most of the wheat grown in Ukraine belongs to the fodder class, that is, the 5th, 6th grade and only 40-50% of the food wheat.

One of the areas of genetic improvement of varieties with the high content of macro- and micronutrients, protein is the transfer of genes from wild relatives, such as spelt. They have a broader genetic diversity and higher concentrations of nutrients than in modern cultivars of wheat. Of particular interest in this direction

is the *Gpc-B1* gene. The presence of the *Gpc-B1* gene significantly increases the content of zinc, iron, manganese, and protein in the starting line.

The use of modern DNA-marker systems, as well as the latest methods for analyzing the qualitative composition of the grain, will enable the possibility of a shorter time, to select promising lines with the high content of the microelement composition and protein.

In the dissertation work, the technology of sampling of the population of wheat carriers of *Gpc-B1* gene of *Triticum turgidum* ssp *dicoccoides* has been developed.

The dissertation was performed at the Department of Industrial Biotechnology of the National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute" and the Department of Molecular Genetics of the Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine within the framework of the state budget theme III-6-16 "Development of Genotyping and Marking Systems valuable biological signs of crops "(state registration number 0116U000173).

In the dissertation, the molecular genetic systems of DNA markers for the first time have been developed to determine the presence of *Gpc-B1* gene of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

For the first time, the allele state of the puorodinene genes in the bread wheat research lines of the carriers of the *Gpc-B1* gene of *Triticum turgidum* ssp *dicoccoides* was investigated and a unique combination of the *Pina-D1b*, *Pinb-D1a* alleles found in domestic wheat varieties were found.

By analyzing alleles of glutenins genes, the extragalactic parameters of flour of experimental lines of the carriers *Gpc-B1* gene of *Triticum turgidum* ssp *dicoccoides* have been proved.

According to the analysis of micro and macro elements, analysis of the total protein content, it was found that the *Gpc-B1* gene of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* in bread wheat research lines increases Fe, Mn, Zn, Se and protein content in comparison with the original Kuyalni variety.

For the first time, yields and physiological indices of experimental lines carriers of *Gpc-B1* gene of *Triticum turgidum* ssp *dicoccoides* have been analyzed in the field.

For the first time, technology has been developed for the selection of bread wheat lines of carriers *Gpc-B1* gene of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

The results of analysis of generations of experimental lines of the carrier *Gpc-B1* gene from *Triticum turgidum* ssp *dicoccoides* were obtained have been used in breeding programs of the Institute of Plant Physiology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, as well as in the Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation of the National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine.

The molecular genetic systems for the determination of *Gpc-B1* gene from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoids* can be used to control the gene in subsequent breeding breaks and directed selection of the required lines.

Molecular genetic systems designed to determine the recombination frequency of the *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219* loci at 6B chromosomes, can later be used to genotype varieties.

Selected F₆ generation wheat lines - *Gpc-B1* carriers from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* can be used to produce a promising variety of wheat with high levels of protein and micro- and macro-elements.

The results of the research, presented in the dissertation, were obtained personally by the author. The results presented in the manuscript are obtained by the competitor personally or by direct participation in the conduct of experiments. The author has personally selected and analyzed modern domestic and foreign scientific literature on the topic of research dissertation work.

The concept of work, planning, and methodology of experimental research, the main results and conclusions of work are formulated and discussed by the dissertation together with the scientific supervisor: Ph.D. Morgun BV

The author personally carried out the allocation of plant DNA; biotechnological approaches have been selected to reveal target genes

polymorphism; uniplex and multiplex PCR with different primers are developed and carried out; Sampling was carried out to determine the content of micro and macro elements; Determination of qualitative parameters of wheat method of infrared spectroscopy; The determination of total nitrogen by the Kjeldahl method was carried out; Field work has been conducted.

The work is the result of independent studies S.Yu. Pokhylko.

According to the results of research, 15 scientific papers, including 5 articles in scientific professional journals of Ukraine (including 2 articles in Ukrainian editions, which are included in international science-computer bases), 10 theses of reports in conferences materials have been published.

Keywords: *Gpc-B1* gene of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, bread wheat, molecular markers, biofortification, protein content and micro- and macroelements.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Дослідження генотипів пшениці м'якої з перенесеним геном *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* / [С. Ю. Похилько, А. В. Трояновська, А. І. Степаненко, О. Ю. Урбанович, О. М. Дуган, О. І. Рибалка, Б. В. Моргун]. // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – 2016. – №2016. – С. 132–136.
2. ICP-MS analysis of bread wheat carrying the *Gpc-B1* gene of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* / [S. Y. Pokhylko, V. V. Schwartau, L. M. Mykhalska, O. M. Dugan, B. V. Morgun]. // Biotechnologia acta. – 2016. – No.5. – С. 64-69.
3. Генетичне різноманіття пуринолінових генів серед ліній пшениці м'якої, носіїв *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* / [Б. В. Моргун, С. Ю. Похилько, В. М. Починок, В. П. Дуплій, О. М. Дуган, О. О. Христан, А. І. Степаненко]. // Фізіологія рослин і генетика. – 2017. – №3. – С. 229-236.
4. Комплексний аналіз вмісту загального білка в зерні м'якої пшениці, яка містить ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* / [С. Ю. Похилько, В. В. Швартау, В. М. Починок, Л. М. Михальська, О. М. Дуган, Б. В. Моргун]. // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2017. – №1. – С. 52–57.
5. Визначення алельного стану генів *Glu-1* в гібридних сім'ях, носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* / С. Ю. Похилько, А. І. Степаненко, О. М. Дуган, Б. В. Моргун. // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – 2017. – Т.21. – С. 168–173.
6. Степаненко А.І. Виявлення цінних алелів високомолекулярних глютенів (ВМГ) пшениці з використанням молекулярних маркерів // А. І. Степаненко, Б. В. Моргун, С. Ю. Похилько // III Міжнародна наукова конференція «Регуляція росту і розвиток рослин: фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти» (Харків, 11-12 листопада, 2014 року) – С. 60-61.

7. Трояновская А. В. Определение ценных аллелей гена *Gpc-B1* в генотипах мягкой пшеницы // А. В. Трояновская, С. Ю. Похилько, Б. В. Моргун, А. И. Степаненко, А. И. Рибалка, С. С. Полищук // II Международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы: материалы конференции (Минск, 13-16 октября, 2015 года) – С.128.
8. Скринник М. М. Розробка кодомінантної системи маркерів для визначення гена *Gpc-B1* в гібридах м'якої пшениці // М. М. Скринник, С. Ю. Похилько, А. І. Степаненко // Біологія: від молекули до біосфери: тези доповідей X Міжнародної конференції молодих учених (Харків, 2-4 грудня, 2015 року) – С.41.
9. Похилько С. Ю. Мікроелементний склад м'якої пшениці з геном *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* // С. Ю. Похилько, А. В. Трояновська, А. І. Степаненко, О. М. Дуган, О. І. Рибалка, Б. В. Моргун // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей X Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (Київ, 22 квітня 2016 року) – С. 75.
10. Похилько С. Ю. Аналіз білкових фракцій озимої пшениці носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*// С. Ю. Похилько, Б. В. Моргун, А. І. Степаненко, О. М. Дуган // I Міжнародна науково-практична інтернет конференція «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації» (Київ, 14-15 грудня 2016 року) – С. 439-445.
11. Похилько С. Ю. Алельний склад пуроіндолінових генів у гібридних сім'ях пшениці м'якої, носіях *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* // С. Ю. Похилько, А. І. Степаненко, О. М. Дуган, Б. В. Моргун // Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Тернопільські біологічні читання – 2017» (Тернопіль, 20-22 квітня 2017 року) – С.287-291.
12. Похилько С. Ю. Виявлення цінних алелей високомолекулярних глютенінів у гібридних сім'ях носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum*

- ssp. dicoccoides* // С. Ю. Похилько, А. І. Степаненко, О. М. Дуган, Б. В. Моргун // Матеріали XI Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 21 квітня 2017 року) – С.63
13. Похилько С. Ю. Аналіз вмісту загального білка в гібридних сім'ях носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum ssp. dicoccoides* методом інфрачервоної спектрометрії // С. Ю. Похилько, А. І. Степаненко, В. М. Починок, О. М. Дуган, Б. В. Моргун // Матеріали Третьої конференції молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, 16-18 травня 2017 року) – С.76
 14. Pokhylko S. Influence of gene *Gpc-B1* of *Triticum turgidum ssp. dicoccoides* on grain protein content in bread wheat // S. Pokhylko, V. Schwartau, V. Pochinok, L. Mykhalska, O. Dugan, B. Morgun // The 3rd international symposium on Eurasian biodiversity (Minsk, 05-08 July 2017) – P.417
 15. Михальська Л. М. Дослідження вмісту білка в гібридних лініях пшениці – носіях гена *Gpc-B1* of *Triticum turgidum ssp. dicoccoides*// Л. М. Михальська, С. Ю. Похилько, В. В. Швартау, О. М. Дуган, Б. В. Моргун // Матеріали VI Міжнародна конференція «Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти» (Львів, 4-6 жовтня 2017 року) – С.34-35

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	16
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	25
1.1 Сучасні напрями досліджень біофортificaції пшениці	25
1.2 Характеристика пшениці м'якої та методи її поліпшення	32
1.3 Молекулярно-генетичні маркери, як інструмент в селекції пшениці.....	38
1.4 Ген <i>Gpc-B1</i> від <i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i>	44
Висновки до розділу 1.....	51
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	53
2.1 Селекційні лінії та сорти у дослідженні	53
2.2 Праймери, що використовувалися у дослідженні	54
2.3 Методи дослідження	55
2.3.1 Виділення загальної ДНК з рослинного матеріалу	55
2.3.2 Постановка полімеразної ланцюгової реакції	56
2.3.3 Гідроліз продуктів ПЛР.....	59
2.3.4 Електрофорез продуктів ПЛР	59
2.3.5 Визначення вмісту мінеральних елементів в зернівках пшениці методом ICP-MS.....	60
2.3.6 Визначення якісних показників пшениці методом інфрачервоної спектроскопії	61
2.3.7 Визначення загального азоту методом К'ельдаля.....	62
2.3.8 Визначення індексу седиментації за методом <i>SDS-30</i>	63
2.3.9 Статистична обробка даних	63
Висновки до розділу 2.....	64
РОЗДІЛ 3. СИСТЕМИ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ЛІНІЙ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ З ГЕНОМ <i>GPC-B1</i> ВІД <i>TRITICUM TURGIDUM</i> SSP. <i>DICOCOIDEOS</i>.....	65

3.1 Розробка молекулярних-генетичних систем ДНК – маркерів для визначення гена <i>Gpc-B1</i> від <i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i>	65
3.2 Скринінг поколінь рослин пшениці – носіїв гена <i>Gpc-B1</i> від <i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> , за допомогою підібраних систем ДНК-маркерів.	68
3.3 Розробка кодомінантних систем мікросателітних маркерів до локусів <i>Xgwm626</i> , <i>Xgwm508</i> , <i>Xgwm193</i> , <i>Xgwm219</i>	73
3.4 Аналіз рослин пшениці F ₃ покоління носіїв гена <i>Gpc-B1</i> від <i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>dicoccoide</i> по підібраним SSR локусам.....	79
3.5 Визначення частоти рекомбінації за локусами <i>Xgwm626</i> , <i>Xgwm508</i> , <i>Xgwm193</i> , <i>Xgwm219</i>	83
Висновки до розділу 3.....	85
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ АЛЕЛЬНОГО СТАНУ ПУРОІНДОЛІНОВИХ ТА ГЛЮТЕНІНОВИХ ГЕНІВ У РОСЛИН НОСІЇВ <i>GPC-B1</i> ВІД <i>TRITICUM TURGIDUM</i> SSP. <i>DICOCCOIDES</i>	87
4.1 Контроль наявності алелей генів <i>GLU-1</i> та продуктивності рослин покоління F ₅	87
4.2 Аналіз алельного складу генів <i>Pina-D1</i> , <i>Pinb-D1</i> у популяції рослин пшениці покоління F ₅	95
Висновки до розділу 4.....	101
РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ ГЕНА <i>GPC-B1</i> ВІД <i>TRITICUM TURGIDUM</i> SSP. <i>DICOCCOIDES</i> НА ВМІСТ БІЛКА ТА МІНЕРАЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ У ЗЕРНІВКАХ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ	102
5.1 Визначення вмісту білка в дослідних лініях-носіях гена <i>Gpc-B1</i> від <i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i>	102
5.2 Контроль вмісту мінеральних елементів в лініях-носіях гена <i>Gpc-B1</i> від <i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i>	107
Висновки до розділу 5.....	114

РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ВРОЖАЙНОСТІ ТА СЕЛЕКЦІЙНИХ ПОКАЗНИКІВ ЛІНІЙ-НОСІЇВ ГЕНА <i>GPC-B1</i> ВІД <i>TRITICUM TURGIDUM</i> SSP. <i>DICOCCOIDES</i>.....	115
Висновки до розділу 6.....	123
РОЗДІЛ 7 УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	124
ВИСНОВКИ.....	128
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	130
Додатки.....	152

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

CIMMYT	– (International maize and wheat improvement center) Міжнародний центр з поліпшення пшениці і кукурудзи
DAF	– (amplification fingerprinting) ампліфікація випадкової послідовності
DIECA	– (sodium diethyldithiocarbamate) диетилдитіокарбамат натрію
ISSR	– (inter simple sequence repeat) інвертовані повтори
MAS	– (marker-assisted selection) селекція за допомогою маркерів
PVP	– (polyvinylpyrrolidone) полівінілпіролідон
QTL	– (quantitative trait locus) локус кількісних ознак
RAPD	– (random amplification of polymorphic DNA) довільно ампліфікована поліморфна ДНК
RFLP	– (restriction fragment length polymorphism) поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів ДНК
SNP	– (single nucleotide polymorphism) поліморфізм одиничних нуклеотидів
SSR	– (simple sequence repeats) прості повторювані послідовності (мікросателіти)
STS	– (sequence-tagged sites) сайти прив`язані до послідовностей
ГСМ	– ген-спрямований маркер
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
ЕДТА	– Етилендіамінтетраоцтова кислота
кДа	– кілодальтон
мг	– міліграм
мл	– мілілітр
мкл	– мікролітр
мкМ	– мікромоль
мМ	– мілімоль
н/в	– немає відомостей

об/хв	–	оберти за хвилину
ПААГ	–	поліакриламідний гель
ПБЦ	–	Південий біотехнологічний центр
ПЛР	–	полімеразна ланцюгова реакція
п.н.	–	пар нуклеотидів
ПФО	–	поліфенолоксидази
сМ	–	сантиморган
ЦТАБ	–	цетилтриметиламоній бромід
ФМ	–	функціональний маркер
хв	–	хвилина
шт	–	штук

ВСТУП

Актуальність теми. Однією з найбільших проблем людства XXI століття – це забезпечення стабільного харчування постійно зростаючого населення земної кулі. За попередніми оцінками до 2050 року на планеті Земля буде більше як 9 млрд осіб [1,2]. У 2015 році хронічне недоїдання серед населення зменшилося з 1 млрд до 795 млн вперше за 25 років [3]. Однак, хоча калорійне недоїдання (гострий голод) зменшилося, недоїдання поживних речовин, так званий «прихований голод», викликаний нестачею вітамінів та мінералів збільшився. Дана проблема, актуальна для 2 млрд людей, а отже являє собою найпоширенішу форму недоїдання [4].

Технології майбутнього сільського господарства будуть направлені на вирішення подвійного завдання: підвищення кількості і якості продуктів для споживання населенням [2].

Пшениця є однією з найважливіших зернових культур в усьому світі, як з точки зору промисловості так і в якості продукту для переробки. Вона являється основним джерелом енергії, білка і клітковини у раціоні людини. Пшениця забезпечує приблизно одну п'яту від загального калорійного складу раціону населення всього світу. На даний момент, близько 95% пшениці, що вирощується в світі, це гексаплоїдна м'яка пшениця (*Triticum aestivum*), інші 5% складає тетраплоїдна тверда пшениця (*Triticum durum*) [5].

Однією із проблем сьогодення України є питання поліпшення якості зерна пшениці. Україна посідає високе місце на світовому ринку зернових: частка в експорті пшениці в середньому складає 5 %; одночасно частка України в експорті пшениці до ЄС складає 32 % [6].

На жаль, українська пшениця у загальній масі поступається за якістю зерна кращим світовим сортам і, як наслідок, у повній мірі не задовольняє внутрішній і зовнішній ринок рівнем якості пшеничного борошна [7, 8]. Більша частина пшениці, що вирощується в Україні відноситься до

фуражного класу, тобто 5-го, 6-го класу і тільки 40-50% продовольчої пшениці.

Використання в селекції пшениці одноманітного генетичного матеріалу, призводить лише до збільшення продуктивності сортів, але це в свою чергу веде до зменшення різноманіття генофонду та збільшення спорідненості, при цьому якісний склад зерна погіршується. Окрім того, створення нових сортів з унікальними властивостями значно обмежується відсутністю ефективного молекулярного супроводу селекції у більшості селекційних центрів України.

Отже, робота над розробкою нових селекційних ліній, що схрещені з віддаленими родичами пшениці, дадуть можливість отримати більш якісне і збалансоване зерно, що надалі дасть можливість, хоча б частково вирішити проблему «прихованого голоду» для українців. Використання сучасних систем ДНК – маркерів, а також новітні методи аналізу якісного складу зерна, дадуть можливість в більш короткий час, відібрати перспективні лінії з підвищеним вмістом мікроелементного складу та білка.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами, планами.

Дисертаційну роботу виконано на базі кафедри промислової біотехнології Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» і відділу молекулярної генетики Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України у рамках державної бюджетної теми III-6-16 «Розробка систем генотипування та маркування цінних біологічних ознак сільськогосподарських культур» (державний реєстраційний номер 0116U000173).

Мета та задачі дослідження. Метою роботи була розробка технології відбору ліній м'якої озимої пшениці носіїв гена *Gpc-B1*, перенесеного з *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Для вирішення поставленої мети були сформульовані такі завдання:

- 1) розробити молекулярно-генетичні системи ДНК-маркерів для виявлення гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в рослинах пшениці м'якої озимої;
- 2) розробити системи молекулярних маркерів для визначення частоти рекомбінації локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219* на 6В хромосомі пшениці – носії гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*;
- 3) провести аналіз алелів генів глютенінів, що зумовлюють екстрасильні показники борошна, та відібрати перспективні лінії м'якої пшениці – котрі несуть ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* і найбільш генетично споріднені до сорту Куяльник;
- 4) провести аналіз алельного стану пуроіндолінових генів в лініях пшениці, носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, та відібрати перспективні лінії, що найбільш генетично споріднені до сорту Куяльник;
- 5) провести комплексний аналіз вмісту загального білка в зерні м'якої пшениці, яка містить ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*;
- 6) проаналізувати генотипи зразків пшениці, які є носіями гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* на вміст мікро- та макроелементів;
- 7) провести аналіз урожайності та селекційних показників дослідних ліній-носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* у польових умовах;

Об'єкт дослідження – поліморфний ген *Gpc-B1* та його прояв у новому генетичному оточенні.

Предмет дослідження – системи молекулярних маркерів, для аналізу дослідних ліній-носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Методи дослідження: молекулярно-генетичні (полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) з різними типами ДНК-маркерів, гідроліз продуктів ПЛР, виділення загальної ДНК з рослинного матеріалу, електрофорез продуктів ампліфікації в агарозному гелі), біофізичні (визначення вмісту мінеральних

елементів методом ICP-MS, визначення якісних показників зерна пшениці (метод інфрачервоної спектроскопії), біохімічні (визначення вмісту загального азоту методом К'ельдаля, визначення індексу седиментації за методом SDS-30), статистичні (оцінка вірогідності отриманих результатів), фізіологічні (вимірювання параметрів росту та врожайності рослин у польових дослідах).

Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше розроблено молекулярно-генетичні системи ДНК-маркерів для визначення наявності гена *Gpc-B1* перенесеного з *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* в пшениці м'якої озимій.

Вперше було вивчено алельний стан пуринодолінових генів в дослідних лініях м'якої пшениці – носіях гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* та знайдено унікальну комбінацію алелей *Pina-D1b*, *Pinb-D1a*, що не була відома до того у вітчизняних сортах пшениці.

За допомогою аналізу алелей генів глютенінів доведено екстрасильні показники борошна дослідних ліній-носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

За результатами аналізів вмісту мікро- та макроелементів і загального білка, встановлено, що результат експресії гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в дослідних лініях м'якої пшениці підвищує вміст Fe, Mn, Zn, Se та білка в порівнянні з вихідним сортом Куяльник.

Вперше проаналізовано врожайність та фізіологічні показники дослідних ліній-носіїв гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* в польових умовах, та встановлено, що лінії є стійкими до полягання, середньорослими з середньою врожайністю 43 ц/га, що на 40% більше ніж у вихідної лінії Glupro.

Вперше розроблено технологію відбору ліній м'якої озимої пшениці, яка містить функціональний ген *Gpc-B1*, перенесений від дикорослого співродича *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати аналізу поколінь дослідних ліній-носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp.

dicoccoides використані в селекційних програмах Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, а також в Селекційно-генетичному інституті Національний центр насіннєзнавства і сортовивчення НААН України.

Розроблені молекулярні генетичні системи для визначення гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* можуть бути використанні для контролю гена в подальших селекційних схрещуваннях і направленою відбору селекційних ліній.

Молекулярно-генетичні системи, розроблені для визначення частоти рекомбінації локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219* на 6В хромосомі, можуть бути застосовані для генотипування сортів.

Відібрані лінії пшениці F₆ покоління – носії гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* можуть бути використані для створення перспективних сортів пшениці з підвищеним вмістом білка і мікро- та макроелементів.

Особистий внесок здобувача. Результати роботи, які викладено в дисертації, одержані автором або за його безпосередньої участі. Планування експериментальної роботи проводилося спільно із науковим керівником. Концепцію роботи, планування, основні результати і висновки роботи сформульовано й обговорено дисертантом разом з к.б.н. Б. В. Моргуном, д.б.н., член-кореспондентом НАН України О. І. Рибалкою, д.б.н., проф. О. М. Дуганом.

Польові досліді планувалися та розглядалися спільно з д.б.н., академіком НАН України В. В. Моргуном та к.б.н. В. М. Починком. Експеримент щодо визначення вмісту мікро- та макроелементів у зерні й аналізу загального нітрогену методом К'ельдаля проводився спільно з д.б.н., член-кореспондентом НАН України В. В. Швартау та к.б.н. Л. М. Михальською.

Автором особисто здійснено виділення рослинної ДНК; підібрано біотехнологічні умови для виявлення поліморфізму цільових генів; розроблено і проведено уніплексні та мультиплексні ПЛР з різними праймерами; відібрано перспективні зразки у кожному поколінні; визначено

якісні показники зерна пшениці методом інфрачервоної спектроскопії; виконано польові експерименти.

Автор висловлює щирю вдячність науковому керівнику к.б.н. Б. В. Моргуну, д.б.н. О. М. Дугану, чл.-кор. НАН України О. І. Рибалці та В.В. Швартау, к.б.н. А. В. Трояновській, к.б.н. А. І. Степаненку й іншим колегам за підтримку та цінні поради під час виконання роботи.

Апробація роботи. Основні матеріали дисертації були представлені на науково-практичних конференціях:

міжнародних: II Международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (Минск, 13-16 октября 2015 года); X Міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2-4 грудня 2015); XI Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Одеса, 12-16 вересня 2016 року); The 3rd international symposium on Euroasian biodiversity (Minsk, 05-08 July 2017); XII Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Умань, 2-6 жовтня 2017 року); VI Міжнародна конференція «Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти» (Львів, 4-6 жовтня 2017 року);

всеукраїнських: X Всеукраїнська науково-практична конференція, присвячена 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 22 квітня 2016 року); Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Тернопільські біологічні читання – 2017» (Тернопіль, 20-22 квітня 2017 року); XI Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 21 квітня 2017 року); Третя конференція молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, 16-18 травня 2017 року);

звітньо-науковий семінар на кафедрі промислової біотехнології Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського».

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 15 наукових праць, у тому числі 5 статей у наукових фахових виданнях України (з них 2 статті у виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз), 10 тез доповідей у збірниках матеріалів конференцій.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, чотирьох експериментальних розділів, узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел та додатків. Роботу викладено на 154 сторінках машинописного тексту, включаючи 19 рисунків і 12 таблиць. Перелік цитованої літератури містить 201 найменування.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Сучасні напрями досліджень біофортificaції пшениці

Біофортificaція – це поліпшення поживних якостей рослин, а саме накопичення необхідних мікро- та макроелементів, вітамінів, вторинних метаболітів, шляхом використання прийомів традиційної селекції, молекулярної селекції рослин або завдяки генно – інженерним підходам [1, 9].

Вона є найбільш ефективною і економічно вигідною у вирішенні питання «прихованого голоду». Цей факт було відзначено Світовою продовольчою премією 2016 року, якою були нагороджені Марія Андраде, Роберто Мванга, Ян Лоумом і Говард Баусон за розробку і впровадження шляхом біофортificaції, накопичення критичних мікроелементів в сільськогосподарських культурах, зменшуючи «прихований голод» у мільйонів людей [10].

У європейських країнах зернові і в першу чергу пшениця, забезпечують близько 20-30% щоденного споживання калорій, в Центральній Азії в середньому 50% [11]. Однак, тканини ендосперму пшениці, не завжди містять достатню кількість вітамінів (особливо вітамінів А, В, Е, С) і мінералів (особливо заліза, цинку, мангану і селену) [12].

На дефіцит вітаміну А страждає понад 250 млн дітей дошкільного віку і 7 млн вагітних жінок у країнах з низьким рівнем економічного розвитку. Нестача вітаміну А є основною причиною сліпоти, яку можна запобігти, а також призводить до загибелі більше ніж 650 тис. дітей в ранньому дитячому віці від діареї, кору, малярії та інших інфекційних захворювань [1,13].

Людські можливості досягли такого технічного розвитку, що вони здатні синтезувати вітамін А, а от організм людини не має можливості синтезувати вітамін А, тому цей вітамін ссавці отримують з рослинного матеріалу. Основним і найбільш ефективним провітаміном А з рослинного матеріалу

являється β -каротин [14]. Добова доза β -каротину для людини складає 5 мг. Було з'ясовано, що на накопичення β -каротину в рослинах, впливають метаболічні гени, що були виділені з пшениці, які кодують фітоєнсінтетазу 1 (PSY1), лікопен ϵ -циклазу (LCYe), каротиноїд β -кільця гідроксилази 1/2 (HYD1/2) та діоксигенази CCD1 і CCD4 [15]. Вже є дані про отримання пшениці з підвищеним вмістом β -каротину (в 31 раз порівняно з не модифікованою пшеницею), тобто 5,06 мкг/г. Це перший приклад успішної генетичної інженерії спрямованої на підвищення вмісту важливого β -каротину в ендоспермі пшениці [14].

Ще одним напрямком біофортифікації пшениці є насичення її вітамінами групи В, а саме B_1 , B_6 та B_9 [1]. Нажаль організм людини не здатний синтезувати дану групу вітамінів самостійно, тому потрапляння цих вітамінів повинно проходити разом з їжею. Джерелом вітамінів групи В є їжа рослинного та тваринного походження. Нестача вітаміну B_1 (тіамін) призводить до розладів нервової і серцево-судинної системи [16]. Дефіцит вітаміна B_6 призводить до різноманітних неврологічних патологій, включаючи хворобу Паркінсона, підвищений ризик розвитку раку, імунodefіциту, а також серцево-судинних захворювань [17-19]. Зниження рівня в організмі B_9 (фолієва кислота) може призвести до мегалобластної анемії, дефектів нервової трубки плода та нервово-психічних захворювань [20, 21]. Важливість достатньої кількості вітамінів групи В для здоров'я людини, має величезне значення. Пшениця є перспективною культурою для генетичної інженерії, що направлена на підвищений синтез вітамінів B_1 , B_6 та B_9 , так як в зернівках проходить повний шлях біосинтезу цих вітамінів [22]. На даний момент вивчені механізми синтезу, накопичення, регулювання цієї групи вітамінів, а також розроблені стратегії з підвищення їх вмісту в злакових культурах [16, 17, 22].

Найчастіше нестачу всіх інших вітамінів у раціоні людини намагаються вирішити внесенням необхідних вітамінів вже в готову продукцію. У

випадку пшениці це додовання необхідних вітамів у борошно. Такий процес називається харчовою біофортificaцією.

Для нормального функціонування організму людини необхідно 22 мінеральних елементи. За оцінками експертів 60% усього населення світу страждає на дефіцит заліза (Fe), більше 30% - на дефіцит цинку (Zn), 30% - на дефіцит йоду (I) і ще 15% - на дефіцит селену (Se). Дана проблема актуальна, як для розвинених так і для країн з більш повільним розвитком [23]. Дефіцит мікроелементів в організмі людини виникає за рахунок того, що сільськогосподарські культури, які є основним джерелом вуглеводів, білків і біодоступних мікроелементів, вирощуються в районах з низькою мінеральною фітодоступністю вітамінів групи B, а також за рахунок вирощування рослин з низьким рівнем поглинання цих елементів.

Найефективнішим вирішенням цієї проблеми є біофортificaція основних сільськогосподарських культур. В Україні основна зернова продовольча культура – це пшениця [24]. У світі пшениця одна із трьох провідних зернових культур і є домінуючою при використанні для харчування людини. Світове виробництво пшениці більше 720 млн тон в рік, більша частина якого йде у харчову промисловість [25, 26].

Для досягнення максимально ефекту біофортificaції зернових культур мінеральними елементами необхідно зробити 5 основних кроків : підвищити поглинання з ґрунту мінеральних елементів, підвищити перенесення мікронутрієнтів в зерно, збільшити транспорт мінералів до ендосперму, а не в лушпиння, зменшити в зернах гальмівних факторів накопичення, збільшити кількість промоторів мінеральної біодоступності в зернах [27]. Реалізація цих кроків, займає досить довгий проміжок часу, так як у рослини існує складний механізм поглинання мінералів з ґрунту, оскільки вони знаходяться у важкодоступних формах [28]. Механізми, які використовують рослини для засвоєння іонів металів з ґрунту, були розділені на 2 категорії. Перша категорія характерна для дводольних і не трав'янистих однодольних. Ці рослини виділяють протони в ризосферу і перетворюють Fe^{+3} до більш

розчинної форми Fe^{+2} і, за допомогою транспортера (IRT) білка транспортує легкорозчинні форми у корені рослин [29]. IRT1 є посередником у поглинанні Zn, Mn та Cd крім Fe [30].

Друга категорія характерна для злакових культур. Вони виділяють в ризосферу хелати металів – фітосидерофори, які зв'язуються з металом і через білок транспортер YS1 транспортують комплексну сполуку з металом в корені [31].

Головними інструментами у боротьбі з нестачею мікроелементів є генетична і агрономічна біофортificaція. Агрономічна біофортificaція включає в себе внесення мінеральних добрив в ґрунт для наповнення ґрунтових запасів мінеральних речовин та стабільного рівня надходження мінералів у зерно на стадії репродуктивного росту. Вона також є необхідною для успішної генетичної біофортificaції зернових культур [32, 33]. Генетична біофортificaція – це процес створення нових генотипів культур з більш високим вмістом мінеральних речовин в зерні [34].

Цинк – це один із найбільш поширених мікроелементів в організмі людини. В середньому у людському тілі міститься 1,5-2,5 г. Він є каталітичним і структурним елементом більше 3000 білків. Також цинк є незамінним компонентом для вуглеводневого обміну, синтезу ДНК і РНК [35]. Більш того, він є необхідним для нормального розвитку та функціонування опосередкованого клітинного імунітету, нейтрофілів та природних клітин-кілерів [36].

Цинк для рослин є важливим мікроелементом, так як приймає участь у формуванні генів толерантності до стресів та формуванні пилкової трубки [37, 38]. Нестача цинку є критичною, як для людини так і для рослин.

Проблему дефіциту цинку, найчастіше вирішують агрономічною біофортificaцією, так як це більш швидкий та економічно вигідний метод в порівнянні з генетичною біофортificaцією [39]. Збільшення вмісту цинку, отримують внесенням ZnSO_4 в ґрунт та обприскуванням рослин. Даний метод дає можливість накопичення цинку в зерні до 58 мг/кг [40].

Максимальний вміст цинку в пшениці було досягнуто у досліді, що проводився у Пакистані: вміст цинку у рослин склав 71,8 мг/кг. Було помічено, що зі збільшенням цинку підвищується врожайність пшениці, але зі збільшення цинку в зерні, зменшувалася концентрація фітинової кислоти, що є основною формою збереження фосфору в зерні, як накопичувача енергії [32]. Робота над створенням генотипів, що будуть обумовлювати підвищений вміст Zn проходить досить інтенсивно. Основним джерелом генетичного матеріалу для цього виступає ген *Gpc-B1* [41, 42]. Генетична біофортифікація за цим напрямком досить складна, але отримання генотипу пшениці, що обумовлює підвищений вміст цинком вирішить питання «прихованого голоду» для всього світу.

Близько чверті населення всієї земної кулі страждає від анемії, що викликана дефіцитом заліза (Fe) [43]. Крім того, навіть незначний дефіцит заліза у дітей призводить до гальмування пізнавальної функції, а у дорослих – до зменшення фізичної працездатності [44, 45]. У рослин залізо відіграє досить велику роль. Воно приймає участь у зміні окисно-відновних клітинних процесів, що пов'язані з перенесенням електронів, або окислювально-залежному каталізі. Надлишки заліза для клітин токсичні, тому організми розвинули жорсткі механізми його регулювання і накопичення. У насінні рослин більша частина заліза зберігається у вакуолях у комплексі з фітатом, тоді як лише 5% всього заліза зберігається у вигляді феретину. Залізо, що накопичується у зерні, представлене у вигляді феретину і виконує функцію захисту рослин від окисного стресу [46].

Для боротьби з дефіцитом заліза у їжі 87 країн світу розробили законодавство про хімічну фортифікацію харчових продуктів солями заліза [44]. Більш стійкий і надійний підхід – це біофортифікація методами традиційної селекції або застосування трансгенних технологій.

Основний ген, що приймає участь у накопиченні заліза в зерні, це VIT1 (vacuolar iron transporter), який обумовлює транспорт заліза у вакуолі, а також приймає участь у транспортуванні марганцю в апарат Гольджі. У

м'якої пшениці виявлено два транспортери TaVIT1 та TaVIT2 на 2 та 5 групі хромосом [48]. Підвищена експресія гена TaVIT2 в ендоспермі пшениці, призводить до підвищення концентрації заліза в цій тканині, при чому TaVIT2 має більший вплив в порівнянні з TaVIT1. Поєднання підвищеної експресії TaVIT2 та NAS може бути одним із підходів для підвищення вмісту заліза [49].

Аналіз пшеничних феретинів в сучасних сортах гексаплоїдної пшениці вказує на наявність двох генів *TaFer1* та *TaFer2*, які розташовані на 5 та 4 хромосомі. Ген *TaFer1* найбільш виражений в ендоспермі і регулює вміст заліза і абсцизової кислоти – рослинного гормону, що індукує період спокою в зерні. Гени *TaFer1* та *TaFer2* кодують дві функціонально різні ізоформи феретину. Направлена надвисока експресія гена *TaFer1-A* призводить до збільшення вмісту заліза на 50-85 % [50].

Пшениця є одним із основних джерел селену в раціоні людини. Селен (Se) є невід'ємним мікроелементом, як для людини, так і для тварин. Він у вигляді селеноцистеїну (SeCys) входить в селенопротеїн, який виконує ряд важливих антиоксидантних функцій [51]. Низький рівень Se в організмі людини може призвести до серйозних проблем зі здоров'ям, в тому числі раку, серцево-судинних захворювань, зниженню фертильності та зниженню функції імунної системи [52, 53].

У рослинах кількість селену залежить від виду рослин, стадії розвитку та біогеохімічних чинників, що впливають на його вміст в ґрунті. В залежності від можливості накопичення і метаболізму селену рослини класифікують на: селен не акумуляуючі, вторинні акумулятори і гіперакумулятори [54]. Транспортування селену в рослину проходить за допомогою транспортерів сульфору, так як вони мають хімічну схожість. Селен засвоюється з ґрунту, як в неорганічній, так і органічній формах.

Неспецифічна заміна цистеїну в білках SeCys і / або метіоніну в SeMet може змінити їх стабільність і функціональну активність. Вважається, що метилювання SeCys і SeMet зменшує включення цих амінокислот у білки і

пояснює здатність деяких рослин накопичувати в тканинах високу концентрацію селену [55].

Одним із напрямків біофортificaції пшениці є мікробна біофортificaція. Рослини пшениці були заражені селен-толерантними бактеріями *Bacillus cereus-YAP6* та *Bacillus licheniformis-YAP7* і додатково було внесено в ґрунт розчин Na_2SeO_4 . Біомаса рослин показала збільшення Se до 375%, S – 40%, Ca – 55% та Fe – 104%, тоді як зерно пшениці містило збільшення Se до 154%, S – 85%, Ca – 60% та Fe – 240% в порівнянні з незараженими рослинами [56]. Даний вид біофортificaції є ефективним, але є ресурсно і економічно затратним.

На даний момент виявлено 16 локусів, для шести ознак пов'язаних з вмістом Se в пшениці, які розташовані на 8 хромосомах 1B, 2B, 4B, 5A, 5B, 5D, 6A і 7D. Внесок кожного QTL у вміст Se варіює від 7,37% до 20,22%. Найвищий внесок у накопичення Se було виявлено у QTL QSsece-7D.2 і становить 20,22% [57]. Отримані результати особливо актуальні для подальшої генетичної біофортificaції пшениці, за напрямком підвищеного вмісту селену.

Найсучасніші технології біофортificaції пшениці, які є суттєво ефективними у програмі біофортificaції за залізом це – оліго-спрямований мутагенез, зворотнє схрещування, РНК- спрямоване ДНК-метилування, або «редагування геному», зазвичай виконуються за допомогою нуклеаз «цинкові пальці», мегануклеаз, химерних нуклеаз TALENs (від Transcription Activator-like Effector Nucleases) і CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) [58].

Отже, виходячи з викладеного вище, напрямки біофортificaції пшениці дуже різноманітні. За деякими напрямками вже отримані успішні лінії з підвищеним вмістом мінералів і вітамінів, які вже застосовуються в сільському господарстві. Є напрями, за якими зроблені лише перші кроки у дослідженні генів, що відповідають за накопичення цінних сполук. Розвиток технологій генетичної біофортificaції є досить швидким, таким чином через

кілька років сподіваємось мати зерно пшениці з усіма необхідними мінералами і вітамінами в необхідній кількості для подолання «прихованого голоду».

1.2 Характеристика пшениці м'якої та методи її поліпшення

Пшениця (*Triticum* L.) – це одна із основних харчових культур, що вирощується більше чим на 17% орних земель всього світу. Пшениця – одна із найдавніших культурних рослин, її вирощують вже понад 10 тисяч років. Її батьківщиною вважається Південно-західна Азія. За довгий період часу сформувалося широке різноманіття роду *Triticum*, що налічує 27 видів, з яких 4 – диплоїди ($2n = 14$), 14 видів – тетраплоїди ($2n = 28$), у тому числі тверда пшениця (*T. durum*), 9 видів – гексаплоїди ($2n = 42$), у тому числі м'яка пшениця (*T. aestivum*), а також 3 види, створені в лабораторних умовах – октаплоїди ($2n = 56$) [59, 60].

Пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L.) – це однорічна озима або яра трав'яниста рослина. Має мичкувату систему коренів, утворюючи в середньому 3-5 стебел, з яких 2-3 продуктивні. Суцвіття у пшениці представлено у вигляді колоса, який складається з членистого стрижня і колосків. На кожному виступі колосового стрижня міститься по одному багатоквітковому колоску. Загальна їх кількість коливається від 16 до 22 шт. Пшениця - самозапильна рослина, дволопатева приймочка і три тичинки розміщені разом на одній квітці [61].

Залежно від остистості колосу, його забарвлення та опушеності колоскових лусок, забарвлення остей і зерна, пшеницю поділяють на різновиди, число яких дуже велике (Еритроспермум, Лютесценс, Мільтурум, Ферругінеум, Грекум, Альбідум, Велютинум, Мелянопус, Гордейформе тощо) [61].

М'яка пшениця має найскладніший генетичний апарат серед усіх видів пшениці, який формувався протягом багатьох тисячоліть. Найпершим видом,

що був використаний людиною для вирощування у якості харчування був *Triticum monococcum*. У цитологічному плані, це диплоїд, що має сім пар хромосом. За рахунок природної гібридизації утворилася пшениця двузернянка *Triticum turgidum*, в якої А – геном від *Triticum monococcum*, а В – геном від давнього виду *Aegilops speltoides*. Вважають, що гексаплоїдна пшениця виникла в результаті об'єднання геномів тетраплоїдної *T. turgidum*, ($2n=28$, АВ-геном) і за різними даними D-геном від *Ae. squarrosa*, *Ae. cylindrica* або *Ae. tauschii* [62-63] (рис.1.1). Тільки в 2014 році Міжнародний консорціум з секвенування геному пшениці (IWGSC – International wheat genome sequencing consortium) опублікував повну послідовність геному пшениці м'якої озимої.

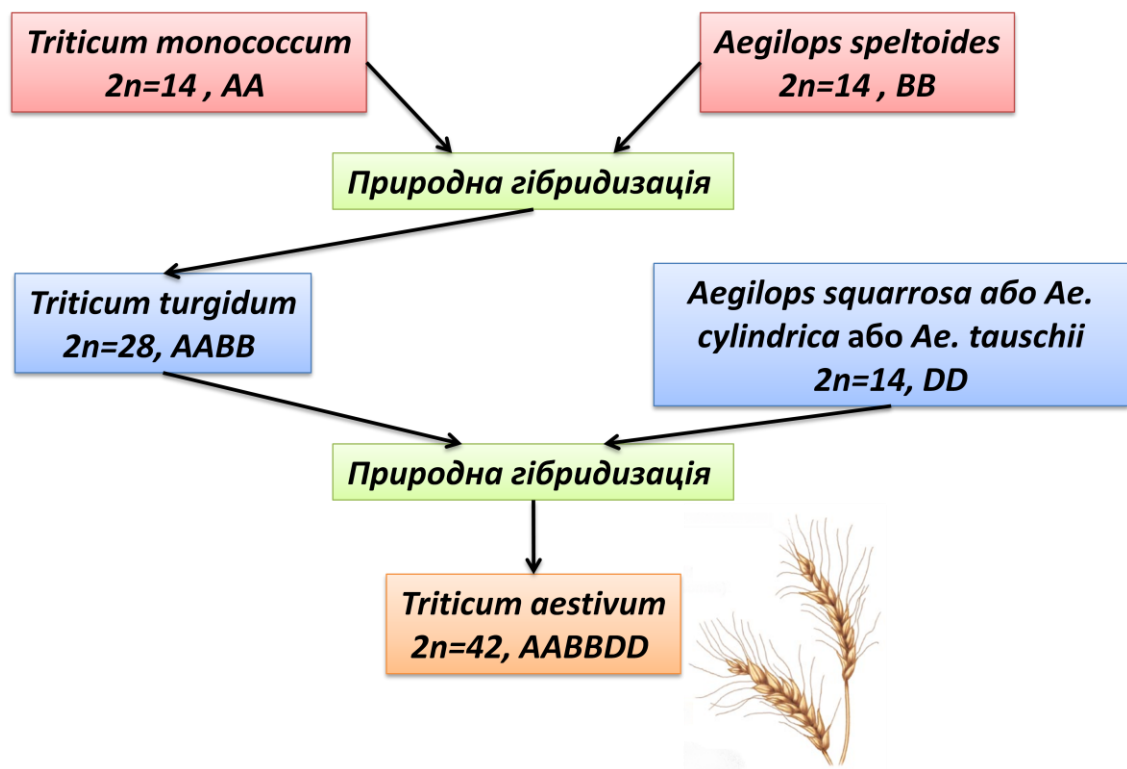


Рис.1.1 Еволюційний процес отримання пшениці м'якої (*Triticum aestivum*)

Гексаплоїдна пшениця має широке різноманіття форм, текстури ендосперму, який буває білий, червоний, коричневий, а також м'який і твердий. Вона має озимі, полуозимі і ярі форми, що дає можливість вирощувати її у різних кліматичних зонах. Оскільки, тільки гексаплоїдні

сортів пшениці володіють D геномом, унікальні властивості розмелювання та хлібопекарської якості борошна відносять до наявності саме третього геному [64].

У середині XX століття виникла серйозна продовольча проблема, відбулося зниження врожайності пшениці, що було критичним при інтенсивному збільшенні темпів зростання населення. Одним із шляхів вирішення цієї проблеми було започаткування програми створення високопродуктивних і стійких до хвороб сортів пшениці. Даний етап в історії був названий як Зелена Революція 1944 року. Батьком Зеленої революції є Норман Борлоуг. Він отримав високопродуктивні сорти пшениці схрещуючи японські карликові сорти з місцевими мексиканськими сортами. Вирощування цих високопродуктивних сортів, дало можливість повністю забезпечити країну зерном. Створені сорти були не тільки високопродуктивними, а й стійкими до хвороб [60, 65]. Отримані нові сорти пшениці з більш високим врожаєм і підвищеною стійкістю до патогенів витіснили традиційні сорти майже в усіх країнах світу.

Для досягнення якісного стрибка в селекції на високу продуктивність і якість зерна пшениці необхідно створювати нові сорти рослин, які б об'єднували у одному генотипі такі ознаки, як висока продуктивність, якість зерна з комплексною стійкістю до хвороб і шкідників, а також наявністю важливих мінералів і вітамінів. Результативність селекції на якість багато в чому залежить від наявності генетичного матеріалу, який сконцентрований у світових колекціях генофонду [66].

В основі створення нових перспективних сортів пшениці лежить класична селекція, використання експериментального мутагенезу, генетична трансформація та віддалена гібридизація.

Розширення спадкової мінливості, добір унікальних мутацій і рекомбінацій, поєднання мутаційної і комбінаційної мінливості — основні методи збагачення застарілого генофонду пшениці. Показано, що під впливом мутагенних чинників, частішає кросинговер, з'являються рідкісні

трансгресивні комбінації, зміщується домінування ознак, змінюються ефекти взаємодії генів, що сприяє повнішій реалізації потенційної спадкової мінливості [66].

Методом експериментального мутагенезу встановлено, що найкращим об'єктом впливу є диплоїдні культури, які легкі для подальшого молекулярного дослідження. Знайдені мішені в диплоїдних культурах є цінним джерелом інформації для об'єднання в усіх гомогенних культурах [67].

За дією електромагнітного випромінювання на гексаплоїдну пшеницю, було отримано 19% мутації за фенотиповим проявом, а також генетичні мутації в алелях з заміною амінокислот [68]. Такі результати свідчать про велику фенотипову і генетичну варіацію, що може бути корисним для селекціонерів при створенні нових сортів.

За допомогою індукованих мутацій створено колекції зразків озимої та ярої пшениці з підвищеним вмістом білка і клейковини в зерні, силою борошна й об'ємним виходом хліба більшими, ніж у вихідних форм, виділено мутанти з вищими показниками суми незамінних амінокислот, каротину, іншими цінними ознаками [66].

Одним із актуальних напрямків сучасної біотехнології пов'язаної з створенням форм культурних рослин з підвищеним рівнем стійкості до стресів, визваних водним дефіцитом, засоленням, екстремальними температурами, а також створення унікальних форм за біохімічним складом є напрямок генетичної трансформації.

Найбільш поширеним методом отримання трансгенних рослин є генетична трансформація з використанням бактерій роду *Agrobacterium* як біологічного вектора для передачі екзогенних т-ДНК в рослинну клітину *in vitro*. Ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин *in vitro* залежить, в основному, від генотипу рослини, типу експланта, генетичного вектора, бактеріального штаму та складу живильного середовища.

Однак, такий підхід має ряд обмежень і недоліків: по-перше, вимагає стерильних умов; по-друге, досить складна і тривала методика; по-третє, під час культивування *in vitro* в рослинних клітинах досить часто відбуваються соматичні мутації або соматоклональної зміни; і, нарешті, у деяких генотипів може взагалі не відбуватися регенерація пагонів. Одним із найсучасніших підходів для здійснення переносу агробактеріальної т-ДНК в однодольні рослини є метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*. [69,70]. Цей сучасний метод дозволяє використовувати генетичні конструкції відносно великого розміру та призводить до мінімальних порушень у кодуєчих послідовностях генів, що переносяться.

На сьогоднішній день розроблено ефективні протоколи агробактеріальної трансформації для основних зернових сільськогосподарських культур, таких як кукурудза, рис, пшениця [71-74].

Agrobacterium-опосередкована трансформація дозволила значно поліпшити врожайність та продовольчі характеристики сільськогосподарських рослин. Були отримані рослини з підвищеною толерантністю до біотичних і абіотичних стресів, стійкістю до шкідників, тощо [75].

На жаль, більшість країн обмежує використання генетично модифікованих організмів, тому все більше селекціонерів повертаються до використання методу віддаленої гібридизації пшениці з її дикими родичами для передачі від останніх корисних ознак.

Принципова значущість методу віддаленої гібридизації полягає в тому, що він дає змогу не тільки поліпшувати сорти існуючих культурних рослин, а й створювати зовсім нові, невідомі раніше культури, тоді як при внутрішньовидовій гібридизації всі зміни мають характер часткових варіацій ознак певного виду.

Окремі види мають споріднені геноми і спроможні при, гібридизації, передавати ознаки звичайним шляхом. Для переважної більшості родичів необхідно застосування певних прийомів перетворення чужорідного

генетичного матеріалу в форму, доступну для ініціації рекомбінаційних процесів і отримання ліній з транслокаціями, заміщенням хромосом і цілих субгеномів [76, 77].

Широкого розповсюдження отримала гібридизація з наступним багатократним індивідуальним відбором [61].

Під час роботи з лініями, отриманими в результаті віддалених схрещувань, що не мають гомологічних хромосом, часто виникає потреба у перенесенні ділянок хромосом від одного виду або роду в хромосому іншого, що брав участь у схрещуванні. Це дає можливість створити форми з бажаним поєднанням ознак батьків і уникнути повернення до ознак того чи іншого батька, що спостерігається при бекросуванні віддалених гібридів.

Найчастіше виникає потреба транслокування ділянки хромосоми від дикорослого виду, якщо схрещувані види генетично подібні, то роботу з поколіннями проводять так само, як і при міжсортівій гібридизації. У гібрид намагаються передати лише окремий ген чи ознаку, наприклад стійкість до певної хвороби чи підвищений вміст білка. Однак, при порушенні кон'югації хромосом у мейозі у гібридів, передати окремі гени від одного виду іншому буває досить важко.

Найефективнішим методом вирішення цієї проблеми є застосування зворотних схрещувань, в результаті чого отримують інтрогресивну форму вихідного виду, що бере від іншого виду лише поодинокі ознаки внаслідок генетичної рекомбінації на основі кросинговеру [78].

Практично всі види-співродичів пшениці (дикі і культурні), які успішно схрещуються з пшеницею, були охарактеризовані за рядом ознак, що мають відношення до технологічних або хлібопекарських властивостей борошна: вміст білка в зерні, вміст пентозанів, вміст та співвідношення складових компонентів крохмалю, седиментації та ін. [79].

Більшість адаптивних ознак дикорослих видів, таких як ксероморфна структура рослин, низька зернова продуктивність, ламкість та спонтанне осипання колосу, погана вимолочуваність зерна, висока жорсткість

колосових та квіткових лусок та ін. є негативними для культурних сортів пшениці [80].

Проблемою віддалених схрещувань є наявність у групі зчеплення генів, що локалізовані на хромосомі дикорослого виду, гена, що має позитивне селекційне значення, який зазвичай тісно зчеплений з іншим геном (генами), що мають негативне селекційне значення і рекомбінувати ці гени шляхом кросинговеру у більшості випадків дуже важко. Навіть високі значення генетичної рекомбінації шляхом кросинговеру між певними генами дикорослого виду приймають нульові значення.

Відсутність кросоверної рекомбінації хромосом суттєво обмежує ефективну інтрогресію потенційно важливого гена. Хромосоми домінуючої більшості дикорослих видів мають суттєві обмеження за частотою генетичної рекомбінації зчеплених генів шляхом кросинговеру, і з цієї причини використання багатьох цінних для селекції пшениці генів від видів-співродичів без застосування індукованого кросинговеру не можливе [81].

Найбільш важливими моментами при створенні ліній і гібридних форм з чужорідним заміщенням окремих хромосом або їх фрагментів є: фертильність гібридів першого і наступних поколінь, цитологічна стабілізація гібридного генома, характер міжгеномних заміщень, прояв господарсько-цінних ознак в гібридному геномі [82].

1.3 Молекулярно-генетичні маркери, як інструмент в селекції пшениці

Молекулярно-генетичні маркери – це кодуюча або не кодуюча послідовність ДНК з відомою локалізацією на хромосомі. Вони дозволяють проводити аналіз геному на рівні ДНК. Генетична мінливість молекулярних маркерів може бути викликана мутаціями або рекомбінацією генів у процесі мейозу. В даний час існує числена кількість методів аналізу поліморфізму ДНК і безліч комбінацій цих методів, що ускладнює створення єдиної докладної класифікації ДНК-маркерів. Молекулярні маркери класифікують

за методами, на яких базується підхід до їх аналізу, та на типах послідовностей, які входять до їх складу [83].

ДНК-маркери умовно поділяють на 3 основні типи, що розрізняються за їх принципом:

1) блот-гібридизація ДНК – метод RFLP (Restriction fragment length polymorphism – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів);

2) полімеразна ланцюгова реакція – методи RAPD (Random amplified polymorphic DNA – довільно ампліфікована поліморфна ДНК), DAF (DNA amplification fingerprinting – ампліфікація випадкової послідовності ДНК), SSR (Simple sequence repeat – прості послідовності, що повторюються), ISSR (Inter simple sequence repeat – послідовності ДНК між простими повторами), AFLP (Amplified fragment length polymorphism – поліморфізм довжин ампліфікованих фрагментів), REMAP (Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism – поліморфізм ампліфікованих послідовностей між фрагментом LTR ретротранспозону і праймером поруч розташованого мікросателітного повтору), STS (Sequence-tagged sites – сайти, прив'язані до послідовностей), IRAP (Inter-retrotransposon amplified polymorphism – поліморфізм ампліфікованих послідовностей між ретротранспозонами) та ін.;

3) технології ДНК-чипів та інформації про нуклеотидні послідовності великих ділянок геному – маркери SNP (Single nucleotide polymorphism – поліморфізм однонуклеотидних замін) [84-87].

Також, маркери поділяються на монолокусні та мультилокусні. Монолокусні маркери успадковуються, як правило, за кодомінантним типом, мультилокусні – за домінантним [88].

Для правильного підбору молекулярних маркерів необхідно враховувати наступні критерії: ціль їх застосування, можливість співставлення отриманих результатів з даними інших науковців, матеріальні витрати та витрати часу, необхідні для проведення досліджень з обраною групою маркерів, рівень поліморфізма і рівень автоматизації процесу [83].

Впровадження в селекційні програми сучасних біотехнологічних

підходів, оснований на використанні молекулярних маркерів, сприяє вирішенню ряду проблем. Одним з таких підходів, які набули розвитку, є маркер-опосередкована селекція (MAS, marker-assisted selection), яка використовується в селекційних програмах економічно розвинених країн в якості методичного прийому для інтенсифікації селекційних процесів [89, 90]. Велика кількість генів і локусів, що контролюють стійкість різних злаків до біотичних і абіотичних стресів, ознаки урожайності та якості зерна, було ідентифіковано і картовано за допомогою ДНК-маркерів [88, 91].

Методи молекулярно-генетичного маркування на основі ретротранспозонів на даний момент є ефективним інструментом в дослідженні генетичного поліморфізму рослин. Застосування молекулярних маркерів дозволило просунутися в картуванні геномів рослин: перша молекулярно-генетична карта, побудована в 1991 р. для м'якої пшениці, містила в 1,5 рази більше локусів і була в 1,2 рази довше класичної генетичної карти [84].

Основний принцип MAS полягає в ідентифікації тісного зчеплення між молекулярним маркером і геном, який контролює ознаку, та використанні зчеплення маркер-ознака в практичних цілях для створення нових сортів і селекційних ліній. Після того як зчеплення маркер-ознака встановлені, створення нових генотипів може йти із залученням традиційних методів селекції (схрещування, беккросування, самозапилення і добір) [83].

Маркерні технології доцільно застосовувати у «непрямій» селекції ознак, які важко фенотипуються, або вартість фенотипового аналізу є високою; ознаки, на прояв яких істотно впливає навколишнє середовище; ознаки з мультигенним контролем. Для генів стійкості до патогенів можуть існувати обмеження щодо карантину або відсутній набір рас патогена для проведення фенотипової оцінки. У деяких випадках фенотипова оцінка може призводити до загибелі рослин [95].

В селекційних програмах з залученням MAS технологій найбільш оптимальними являються три етапи, коли найбільш доцільніше

використовувати ДНК – маркери. На першому етапі у лінії донора визначають хромосомну локалізацію фрагмента, що містить «цільовий локус». Це особливо важливо для ознак, які важко визначити фенотипово або для ознак з рецесивним наслідуванням. Другий етап рекомбінантна селекція включає в себе оцінку рекомбінаційних подій навколо фрагменту донорського геному і виявлення фланкуючих маркерів, зчеплених з локусом. На третьому етапі проводять аналіз геному рекурентних батьків з використанням маркерів, що локалізовані, по всьому геному і не зчеплені з донорським фрагментом[89]. Використання ДНК – маркерів у поєднанні з беккросними програмами дозволяє скоротити необхідність беккросів до 2-4, коли зазвичай для інтрогресії одного домінантного гена необхідно мінімум 6 [96, 97].

На сьогодні, ефективним і раціональним інструментом MAS – селекції є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), яка дає можливість вибірково збільшувати малу концентрацію бажаних фрагментів ДНК для їх якісної ідентифікації [98].

В останні роки, широко поширення набули функціональні маркери (ФМ), які розробляються на основі нуклеотидних послідовностей гена. Тому вони дозволяють не тільки виявляти дану послідовність в геномі, але і розрізняти її алельні варіанти. ФМ базуються на поліморфних послідовностях і дозволяють контролювати фенотиповий прояв ознаки [99]. Важливо, що не кожен ген-спрямований маркер (ГСМ) є функціональним маркером, тому що не кожен ГСМ може виявляти фенотипову варіацію ознаки [100]. ГСМ можуть також визначати ділянки цільових послідовностей, які не транскрибуються [101, 102]. Для пшениці розроблена велика кількість функціональних маркерів до генів, які детермінують якісні ознаки, генів стійкості до абіотичних та біотичних стресів та генів, які визначають фізіологічні показники рослини [92, 93, 94].

У США, Європейському Союзі, Японії, Китаї, Австралії селекціонери широко використовують в своїй роботі молекулярні маркери. В США діяла

програма «MAS wheat», яка тривала 4 роки з 2001 по 2005. У цій програмі було використано маркер-асоційовані зворотні схрещування для включення 27 різних генів стійкості до хвороб та шкідників і 20 алелів із позитивним впливом на хлібопекарські та макаронні властивості у близько 180 ліній, адаптованих до основних регіонів виробництва пшениці у Сполучених Штатах. Для цього було здійснено більш, ніж 3000 зворотних схрещувань з використанням маркерів і, в результаті – створено близько 240 беккросних ліній, 45 з яких реалізовано [103, 104].

У CIMMYT (Міжнародний центр з поліпшення пшениці і кукурудзи) у програмах селекційного поліпшення пшениці використовуються маркери 25 різних генів стійкості до шкідливих комах, вмісту білка та інших агрономічно цінних ознак [105]. Відомо щонайменше 20 маркерів для *Rht*, *Ppd*, *Vrn* і генів стійкості до патогенів, за допомогою яких у CIMMYT тестують блоки схрещувань у гібридних популяціях F_3 . Аналізуються великі обсяги: наприклад у 2009 р. було проаналізовано 25000–30000 рослин і отримано 75 000 точок даних. Ця програма також включає селекцію на стійкість проти мультівірулентної раси стеблової іржі Ug99 шляхом об'єднання основних генів у піраміди (наприклад, Sr25 + Sr26; Sr25 + 1A1R) [106].

В Україні, як аграрній державі є важливим завданням збереження і вивчення генетичної плазми сільськогосподарських культур, а молекулярні маркери є чудовим інструментом для вирішення цих задач.

Перші кроки з впровадження молекулярної генетики в розвиток селекції в Україні зробили ще в 1975-1977 році у Всесоюзному селекційно-генетичному інституті Ю.М. Сиволап, Л. Ф. Дяченко і Т.Г. Вербицька. Вчені досліджували мінливості генома пшениці в еволюційному плані.

Першим центром в незалежній Україні з молекулярного маркування ознак сільськогосподарських рослин є Південний біотехнологічний центр (ПБЦ), де об'єктами дослідження є гени, які контролюють стійкість до різних патогенів, стресів, якості зерна тощо. Сорти пшениці м'якої української

селекції охарактеризовано за генами, які визначають тип і темп розвитку *Vrn*, *Eps*, *Vrd*, чутливість до фотоперіоду *Ppd* та ін. [101,102].

У наукових програмах, що виконувались у ПБЦ, вивчали можливості використання різновидів молекулярних маркерів, а саме: RAPD, SSR, ISSR для диференціації, ідентифікації та реєстрації генотипів *T. aestivum* L.. За результатами досліджень було з'ясовано, що мікросателітний аналіз є найефективнішим методом диференціації та ідентифікації, який може використовуватися для паспортизації сортів м'якої пшениці і дозволяє виявляти генетичну гетерогенність та порівнювати вітчизняні сорти з сортами світової селекції [109].

Важливий напрямок застосування молекулярних маркерів був знайдений у дослідженнях за локусами *Glu-1*, які є цінними для хлібопекарської якості. Авторами було проаналізовано 145 сортів пшениці української та зарубіжної селекції і виявлено, що найкращими показниками хлібопекарської якості будуть володіти Доброчин, Жайвір, Запорука, Зиск, Зміна, Зорепад, Куяльник, Панна, Селянка, Скарбниця та Ужинок, які мають наступний алельний склад *Glu-A1b* (або *a*), *Glu-B1a1* та *Glu-D1d* [110].

Широке застосування молекулярні маркери знайшли до генів, що відповідають за якісні показники м'якої пшениці. Розроблені маркерні системи з визначення генів пуринолідів *a* та *b*, що відповідають за твердозерність пшениці. Авторами було показано, що більшість українських сортів (95 %) мають алелі *Pina-D1a* і *Pinb-D1b*, тобто є твердозерними, але їхній фізичний показник твердозерності варіює досить широко – від 51,0 до 88,4 ум. од [111].

За допомогою молекулярних-маркерів проводять ДНК-типування генотипів рослин та гібридних ліній [112]. Вони використовуються під час вивчення й тестування колекції генбанків, реєстрації й паспортизації сортів. У ряді досліджень [113-114], рекомендоване використання МС-аналізу та розробленої бази даних алелів МС-локусів українських сортів для проведення доборів з метою створення сортів лінійного типу на основі

існуючих сучасних гетерогенних сортів пшениці, підвищення ефективності реєстрації нових сортів пшениці м'якої озимої [115], а також для диференціації та ідентифікації сучасних сортів, зокрема тих, що мають спільне походження з одного селекційного центру, під час проходження експертизи в системі державного сортовипробування.

Отже, виходячи з літературних даних, видно, що молекулярні маркери мають надзвичайно широко впроваджуються в усьому світі для полегшення складних процесів контролю перенесення цінних генів у різноманітних селекційних та дослідницьких програмах. Різноманіття молекулярних маркерів досить широке. Вони засновані на різноманітних поліморфних послідовностях, та мають різний базовий метод визначення поліморфізму. Проте, для використання у прикладній селекції рекомендується використання направлених функціональних маркерів, які є більш зручними та точними у роботі. ФМ є цінним інструментом для впровадження у процес селекції пшениці м'якої. Перевагою ФМ є їхній зв'язок з фенотиповим проявом, а також простота інтерпретації результатів дослідження і валідації маркерів в умовах вітчизняної методології отримання сортів зернових культур.

1.4 Ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*

Пшениця є однією з найважливіших зернових культур в усьому світі, як з точки зору промисловості так і в якості продукту для переробки. Вона являється основним джерелом енергії, білка, мікроелементів і харчових волокон у раціоні людини. У європейських країнах, зернові, в першу чергу пшениця, забезпечують близько 20-30% щоденного споживання калорій, 25% білків, а також є важливим джерелом мікроелементів, забезпечуючи приблизно 16% Fe і 12% Zn [116]. При цьому, у пшениці не завжди міститься достатня кількість мікроелементів для належного забезпечення раціону людини. На даний момент, близько 95% пшениці, що вирощується в світі, це

гексаплоїдна м'яка пшениця (*Triticum aestivum*), інші 5% складає тетраплоїдна тверда пшениця (*Triticum durum*) [5, 117].

Багатофункціональність та незамінність пшеничного борошна зумовлена особливістю структурного складу білків та їх кількістю. Білковий комплекс пшениці складається з гліадинів, глютенінів, альбумінів і глобулінів. Більша частина пшеничного зерна – запасаючі білки гліадини і глютеніни, що складають 80-85% від загального вмісту білка в зерні. Альбуміни і глобуліни – структурні і ферментні білки алеїронного шару і зародку [118]. Запасаючі білки несуть основне функціональне навантаження, щодо їх впливу на якість клейковини. Глютеніни здатні до полімеризації шляхом утворення інtermолекулярних -S-S-зв'язків, що формують макромолекулярний каркас клейковини і відповідають за еластичність та пружність тіста [119]. Гліадини суттєво впливають на фізичні показники тіста, такі як його в'язкість і, особливо, розтяжність [120].

Масова частка білка є важливою характеристикою оцінки якості зерна, яка нормується згідно ДСТУ 3768:2010 . Відповідно до державного стандарту пшениця 1-го класу повинна містити масову частку білка в зерні не менше 14%, 2-го класу – не менше 12,5%, 3-го – не менше 11%. Проте в останні десятиріччя, на противагу зростанню врожайності, якість зерна погіршується, включаючи показник масову частку білка.

Складність у процесі підвищення у зерні вмісту білка викликає високий екзогенний ефект нового генетичного матеріалу і складність комплексу генетичних систем, що регулюють процес вбудовування нового генетичного матеріалу [121]. Вміст мікроелементів в зерні пшениці детермінується генетично та залежить від факторів навколишнього середовища. Одним із чинників формування зерна високої якості є оптимальний вміст у рослинах важливих макро- та мікроелементів. Мікроелементи, незважаючи на їх низькі концентрації, беруть активну участь у всіх життєво важливих біохімічних процесах [122]. Висока біологічна активність мікроелементів в значній мірі пов'язана з ферментативним каталізом, що визначає їх участь у процесах

фотосинтезу, дихання, азотного і фосфорного обмінів. Дефіцит мікроелементів у рослинах порушує нормальний перебіг фізіолого-біохімічних процесів і виключає отримання високих врожаїв якісного зерна [123]. Рівень реутилізації мікроелементів у генеративні органи пшениці достатньо низький, тому є перспективним напрямом генетичного поліпшення культури. Одним із напрямків генетичного поліпшення сортів щодо підвищеного вмісту макро- та мікроелементів, білка є перенесення генів від диких родичів, таких, наприклад, як спельта, полба [124, 125]. Вони мають більш широке генетичне різноманіття і більш високі концентрації поживних речовин, ніж у сучасних культурних сортах пшениці [126]. Особливий інтерес в цьому напрямку, представляє ген *Gpc-B1* [127, 128].

Вперше підвищений вміст білка був ідентифікований серед популяції дикого тетраплоїдного еммера (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*) в Ізраїльській лінії FA-15-3 [129]. Подальша робота, була направлена на перенесення кожної окремої хромосоми з лінії FA-15-3 в сорт тетраплоїдної твердої пшениці Langdon. Було з'ясовано, що саме 6В хромосома є основним джерелом генетичної варіації, що надає підвищений вміст білка (*Gpc*) [130]. Це й QTL був віднесений до 0,3 cM регіону, що розташований на короткому плечі 6В хромосоми і характеризується, як єдиний менделівський локус, названий *Gpc-B1*(рис.1.2).

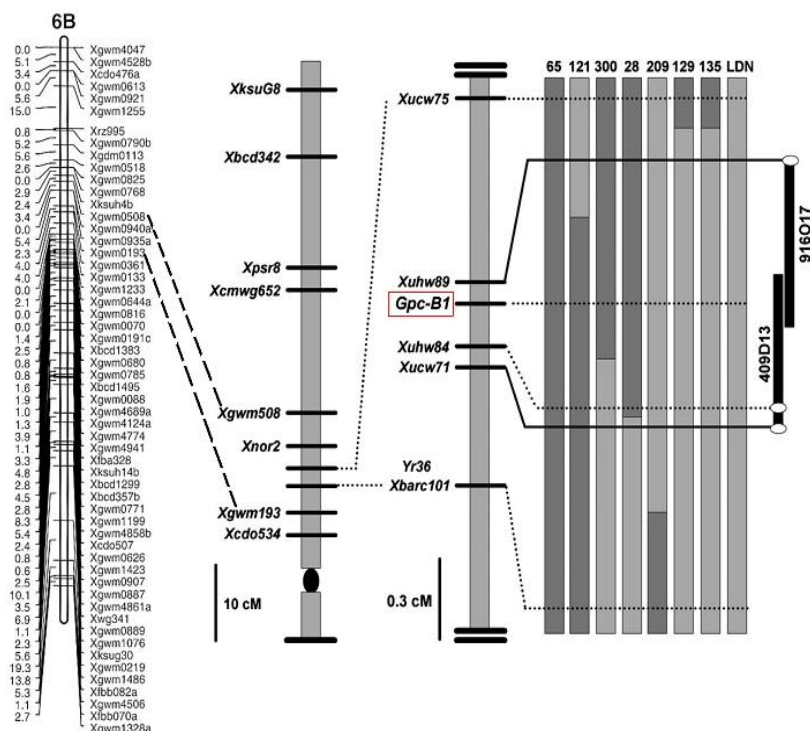


Рис. 1.2. Генетична карта, яка вказує розташування гена *Gpc-B1*.

Ген *Gpc-B1* в 2008 році був секвенований групою вчених під керівництвом Д. Дубковського в США та запатентований патентом EP1883291. Послідовність гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* var. *dicoccoides* (GenBank: H1071313.1) представлена на рис.1.3

```

1  cgggtggcgag  ttcgagtcct  gaggagagca  ttatTTTTtac  ccgTTTTTtg  ttttgcgagc
61  gtttttatgtt  ctctggtttg  cactcttcat  gggccggccc  agcgcggggc  gctgcaggcg
121  tcaggagcgc  caacggggcg  ctgcagcgcc  gtataggagc  tcctacatg  tccttctaac
181  catccaatca  cagattggtt  tgctTTTTTT  gacgaactga  tttgTTTTta  attgtttgaa
241  ttgcttacca  catgtttcac  gtggtctgac  gaactgggtg  ggttcataag  gtgtgtgaaa
301  tgagggtcacg  atgttaaaaag  aggtaccctt  tgattagttg  cttcccgaga  aacatctgtg
361  ctaaaaaaga  gagcaagaag  aggtcacgat  gttggtatca  tgcggcccac  cagaatatgc
421  tgaaatggag  ctcagcacgg  gccaaacaaa  tacctagccc  aggaagctac  gaagccgggtg
481  caaactacca  ggccttaagc  cgaaggatgg  ggcaaggatga  accgtgtccg  gtccggctcc
541  cccgcgtccg  cccgcataga  aggaagtggc  ggaatactct  tcccatccca  gaagaaaaaa
601  taaggtagga  agcggaatgg  gtggccgtgg  tcgcgcgagc  ttgcgccgtc  cgggtggcgat
661  ctgacacgcg  gtacgagcgg  cggccggcat  acgtgtccag  cggcgacggg  cccgcggccc
721  cgggctaggt  acaacggtgc  cgtattttct  cctgtctctc  ctgccacgg  tttcacagcc
781  gccccgaaac  caccagagct  cccacagcag  atcactcgcc  cgcctctcct  ctcttctctc
841  ccaaccgtcg  ctgtaacaaa  tcccactccg  ttccttctct  cacactacct  agaagctttg
901  gcagttgagt  taggtgccca  ccacaggggt  gctctgggtg  gatcatctgg  tgtgtttgtt
961  ggtagctagc  tagctagggg  aagaagatct  gatgagggtc  atgggcagct  ccgactcatc

```

```

1021 ttccgggctcg gcgcaaaaag caacgcggta tcaccatcag catcagccgc cgcctccgca
1081 gcgggggctcg gcgccggagc tcccgcggg cttccggttc caccgcacgg acgaggagct
1141 ggtggtgcac tacctcaaga agaaggccga caaggcgccg ctccccgtca acatcatcgc
1201 cgaggtggat ctctacaagt tcgacccatg ggagctcccc ggtatgttat gtctatctcg
1261 tcggccggcc gtgcttactt tatcaagcgc cgcaaatttt cggtgcaatt aaataatcga
1321 ataatccatc catctcatgc ttatactcct gtgcacaagt agtattttta tattcttcca
1381 gtacacatgt gtgtagatgg tttatgtatg tgatcctgtc gtgcttgttc atgcgctcgg
1441 gatccggatc catcagagaa ggcgaccatc ggggagcagg agtggtagctt cttcagcccc
1501 cgcgaccgca agtaccctaa cggcgcgccg ccgaaccggg cggcgacgtc ggggtactgg
1561 aaggccaccg gcacggacaa gcctatcctg gcctcgggga cggggtgcgg cctgggtcgg
1621 gagaagctcg gcgtcaagaa ggcgctcgtg ttctaccgcg ggaagccgcc caagggcctc
1681 aaaaccaact ggatcatgca cgagtaccgc ctcaccgacg catctggctc caccaccgcc
1741 accaaccgac cgccgccggt gaccggcggg agcagggtcg ctgcctctct cagggtagct
1801 acacgtgtcg atcgacggt ctagcagtat ttaattgtc tccagcttaa ttagggatt
1861 gttgatggtt gatgaagtta attatgtacc gtcgtctcat cagttggacg actgggtgct
1921 gtgccgcatc tacaagaaga tcaacaaggc cgcgcccgcc gatcagcaga ggaacacgga
1981 gtgcgaggac tccgtggagg acgcggtcac cgcgtagccg ctctatgcca cggcgggcat
2041 gaccggtgca ggtgcgcatg gcagcaacta cgcttcacct tctactgctc atcatcagga
2101 cagccatttc ctggacggcc tgttcacagc agacgacgcc ggcctctcgg cgggcgccac
2161 ctcgctgagc cacctagcag cggcggcgag ggcaagcccg gctccgacca aacagtttct
2221 cgccccgtcg tcttcgacct cgttcaactg gctcgatgcg tcaccagtcg gcatcctccc
2281 acaggcaagg aattttcctg ggtttaacag gagcagaaac gtcggcaata tgtcgctgtc
2341 atcgacggcc gacatggctg gcgcagtgga caacggtgga ggcaatgcgg tgaacgccat
2401 gtctacctat cttcccgtgc aagacgggac gtaccatcag cagcatgtca tcctcggcgc
2461 tccgctggtg ccagaagccg ccgcgccac ctctggattc cagcatcccc ttcaaatatc
2521 cggcgtgaac tggaatccct gatcaaatga tatgaacacc acatacgggc atgcacgcac
2581 gcatgcataa cttttgcaag tcgtacaaca ttgctagcca gtagttgttg cagtttgtgg
2641 tagtcccttt cagtgcacac tgagtagttg catgcacatc accactgcat ggatatatat
2701 ggctgcattg caccatgggc acgtacttgt gcgaacttgc tagccatata tatagtagta
2761 caatagctag gagtattttc gaagtacaaa aaaatcataa catagtactc catatatatt
2821 gtaataaata tatttttttag atatatatga gtatgataat agcttcatat gcatatacta
2881 tattgtagtg catatagtaa atatatatgc agttgattac aaaccccagt cagatacaat
2941 ttttggccgg gtctagctac ttatcatgta taaatagggg tgtatgtaaa tgagcaacgc
3001 atggtaactg catgcacgcg tatcattgat ctatatggac gtacactgta taactttttt
3061 tttcatgaat aagatttgcg aactagtatg tcgcagtggg ttagttatta tgtgaatggc
3121 ccttatatat atatatatat atatatatat atatatatat atatgttcga aaaatgtgtg
3181 ttatctcctt aatttcatth ttgaaagaaa aacatcatct tgacagttgt cacatgtcca
3241 agctgtccgt ggatgcctcc ctaatcgccg ccgcgctcat gtaagttcta tgttgccctg
3301 ccaccacact taaactaggg aaagatatgt gaacgtaaga cataagtaca tctctatttc
3361 atcctttcat tcagctttta agaggtgtgc cacatgatta tacaatgtct cttagtagtc
3421 tataaacagt tttatgtggg acacgctggg atccctgtcc tagctagatc aaaaggccag
3481 caggggggtg gggggggggg ggggtacata cgtgtagatg tactaattca acgtatgttc
3541 cc

```

Рис.1.3 Послідовність гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*

Gpc-B1 направляє транскрипцію NAC сімейства білків, які в інших видів рослин відповідають за регулювання процесів розвитку, старіння, захисту рослин і відповідь на стресові фактори [131].

Вченими проведені експерименти, які демонструють, що *Gpc-B1* є важливим регулятором процесу старіння, транслокації білків та мікроелементів з відмираючого листа до зернин пшениці, що розвиваються [132, 133].

Проведено дослідження з поширення гена *Gpc-B1*. Серед сучасних сортів пшениці, як виявилось в більшості сортів, знаходиться не функціональний алель *Gpc-B1*, за винятком деяких сортів фінсько-скандинавського поширення [128].

Ефект локусу було ретельно вивчено у твердій ярій пшениці та показано суттєве збільшення у порівнянні з вихідною лінією вмісту в зерні цинку (60 мг/кг проти 47,5 мг/кг), заліза (44,2 мг/кг проти 35,9 мг/кг), марганцю (53,9 мг/кг проти 40,9 мг/кг) та білка (14,4% проти 10,8%) [129,134]. Транскрипційний аналіз показав, що ген *Gpc-B1* пов'язаний зі змінами рівня експресії декількох транспортерів Fe і Zn, за рахунок чого, скоріше за все підвищується вміст цих мікроелементів [133].

Аналіз 20 сортів ярої пшениці, що були створені в 20 столітті в Швеції, показав, що 5 сортів, що несуть ген *Gpc-B1* дикого типу мають підвищену концентрацію в зерні Mg, P та S в порівнянні з сортами, що несли не функціонуючий ген *Gpc-B1* [135].

Введення нового гена в адаптований високопродуктивний сорт, завжди критично оцінюється з точки зору його впливу на врожайність. З 15 досліджень, у яких проаналізували вплив гена *Gpc-B1* на врожайність, виявили, що 79% не мали особливих відмінностей, 17% виявили позитивний вплив на урожайність, тоді як 4% показали, зменшення врожаю. З цього можна зробити висновок, що варіація врожайності залежить не лише від присутності певного специфічного гена, але й від генетичного оточення

сорту, в якому ген експресується та, звісно ж від взаємодії його з навколишнім середовищем [136].

Прискорене старіння у пшениці, при наявності гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoide*, спостерігалось у всіх сортах твердої пшениці. Очікується, що більш швидкий початок старіння, що пов'язаний з геном *Gpc-B1*, скоротить період вирощування зерна, що опосередковано вплине на масу 1000 зерен. У двох дослідженнях, зменшення маси 1000 зерен було пов'язане з прискореним старінням, у 6 рядках середнє зниження маси відбулося на 3 г і прискорення старіння всередньому на 2,6 дня [129, 137]. Також було проведено дослід, який показав що вміст крохмалю в зерні пшениці, найбільш ймовірно залежить від потенціалу накопичення тканини, ніж від тривалості фотосинтезу [138].

Ефект наявності гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* позитивно впливає на хлібопекарські якості борошна. Наявність гена значно збільшує водопоглинання борошна, зменшує час змішування, час підйому до максимального об'єму, що призводить до збільшення об'ємів готової продукції. У тетраплоїдній пшениці наявність гена було пов'язане з покращенням якості глютену, та підвищення пружності звареного макаронного виробу [139, 140].

Узагальнюючи дані різних досліджень, видно, що вплив гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* помітніше діє на тетраплоїдну тверду пшеницю, ніж на гексаплоїдну м'яку пшеницю. Це й факт можна пояснити дозуванням генів. Тетраплоїдні сорти, мають один функціональний алель *Gpc-B1* і один не функціональний алель *Gpc-A1*, тоді як в гексаплоїдній пшениці інтрогресійну функцію алелю *Gpc-B1*, складає вже два алелі *Gpc-A1*, *Gpc-D1* [141].

Для отримання цінного нового сорту пшениці необхідно збалансовано підібрати відповідний генотип в комбінації з впливом навколишнього середовища та ідентифікувати процес за допомогою MAS селекції. Різні стратегії можна використовувати для покращення сортів пшениці,

використовуючи ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Один із підходів це використання MAS для відбору гібридів з функціональним алелем *Gpc-B1*, одночасно застосовуючи фенотиповий відбір для інших важливих факторів, таких як врожайність, стійкість до хвороб і т.д. Це й підхід був застосований у серії багаторівневих польових випробувань і проявив себе як успішний підхід до створення нових сортів [142].

Інша можлива стратегія – це поєднання гена *Gpc-B1* дикого типу з іншими алелями або QTL пов'язаними з врожайністю. Таке дослідження було проведене на Індо-Гангській рівнині. Було використано ген *Gpc-B1* дикого типу та QTL, що призвело до збільшення маси 1000 зерен. Всі п'ятнадцять ліній з цими алелями виявили значне підвищення білка і мікроелементів Fe та Zn, а також у дванадцяти ліній спостерігалось значне збільшення маси 1000 зерен у порівнянні з контрольними лініями [143].

Висновки до розділу 1

Отже, виходячи з викладеного вище, напрямки біофортificaції пшениці дуже різноманітні і мають надзвичайно важливе значення у розвитку сільського господарства. За деякими напрямками вже отримані успішні лінії з підвищеним вмістом мінералів і вітамінів, які вже застосовуються в сільському господарстві. Є напрями, за якими зроблені лише перші кроки у дослідженні генів, що відповідають за накопичення цінних сполук. Розвиток технологій генетичної біофортificaції є дуже стрімким, таким чином сподіваємось у найблищому майбутньому мати вже зерно пшениці, що задовольнить більшу частину потреб людства. Великий інтерес у напрямку покращення харчових якостей пшениці представляє ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, асоціюється з суттєвим збільшенням вмісту білка та важливих мікроелементів, Fe, Mn та Zn у різних генетичних фонах і середовищах. Він позитивно впливає на

якість борошна для виготовлення хлібобулочних та макаронних виробів. Оскільки функціональній алель *Gpc-B1* дикого типу, що одержують з *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* зустрічається досить рідко в сучасних сортах м'якої пшениці, його інтрогресія в селекційні програми країн є надзвичайно важливим. Привнесення даного гена підвищить якість зерна пшениці, та зможе позитивно вплинути на вирішення світової проблеми «прихованого голоду».

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Селекційні лінії та сорти у дослідженні

В якості генетичного матеріалу в роботі було використано:

- 1) сорт озимої м'якої пшениці Куяльник, який був наданий Селекційно-генетичним інститутом – Національним центром насіннєзнавства та сортовивчення НААН України, м.Одеса. Сорт Куяльник – екстрасильний, високоврожайний 6,72 – 9,88 т/га. Його занесено до Державного реєстру сортів рослин України в 2003 році для вирощування в степовій та лісостеповій зонах. Характеризується сорт Куяльник середньоранньою стиглістю, посухо- та жаростійкістю. Сорт відноситься до сильних сортів[144, 145].
- 2) гексаплоїдна лінія ярої пшениці Glupro – донор гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, яка була надана професором Каліфорнійського університету, США Jorge Dubcovsky. Лінія характеризується підвищеним вмістом білка та мікроелементів Fe, Mn, Zn, але низькою продуктивністю (врожайністю).
- 3) 160 рослин популяції озимої пшениці. Надані Селекційно-генетичним інститутом – Національним центром насіннєзнавства та сортовивчення НААН України, м.Одеса. Ці рослини походили від схрещування високоврожайного районowanego сорту Куяльник та лінії - донора Glupro, для отримання високоврожайних ліній з підвищеним вмістом білка і мікро- та макроелементів і вивчення генетичного фактора *Gpc-B1* та його прояву.
- 4) Сорт Золотоколоса, наданий Інститутом фізіології рослин і генетики НАН України, використаний в якості контрольного сорту носія алелю *Glu-D1a*. Озима м'яка пшениця, занесена до реєстру сортів рослин

України в 2006 році для вирощування в зонах степу, лісостепу та полісся України. Високоврожайний, середня врожайність 8,61 т/га, сорт віднесений до сильних пшениць[145].

- 5) Сорт Langdon з заміщеною 6В хромосомою з носієм гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, яка була надана професором Дж. Дубковським, Каліфорнійський університет, Девіс, США.

2.2 Праймери, що використовувалися у дослідженні

Перелік праймерів представлено в таблиці 2.1. Праймери синтезовані німецькою фірмою Metabion. Робочі розчини праймерів концентрацією 10 мМ зберігалися у стерильному ТЕ буфері pH 8,0 за температури – 20 °C.

Таблиця 2.1. Перелік праймерів, що були використані у дослідженнях

№	Цільовий ген, алель	Послідовність	Розмір амплікону, п.н.
Ген <i>Gpc-B1</i> від <i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i>			
1.	<i>Gpc-B1</i>	5'-TTCACAAACTAAGGGGAGGGA-3' 5'-CTACCATCGAAAGTTGATAGGGA-3' [146]	1600
2.	<i>Gpc-B1</i>	5'-TCTCCAAGAGGGGAGAGACA-3' 5'-TTCCTCTACCCATGAATCTAGCA-3' [147]	122 – <i>Gpc-B1</i> від <i>T. turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> , 126 – <i>Gpc-B1</i> від <i>T. aestivum</i>
Референтні гени пшениці			
3	<i>actin</i> – пшениці	5'-GAGGGATACACGCTTCCTCA-3' 5'-GAAAGTGCTAAGAGAGGCCAAA-3' [148]	547
4	<i>TaTM20</i> – білок-транспортёр іонів металів пшениці	5'-AAGGGTTGCTCCTCTTCGCGATCTTG-3' 5'-GTACATGCCAGCACCGTATGGATTG-3' [149]	934
Мікросателітні локуси до 6В хромосоми пшениці			
5	<i>Xgwm626</i>	5'- GATCTAAAATGTTATTTTCTCTC-3' 5'-TGACATCAGCTAAACGTGT -3' [150]	130 – <i>Gpc-B1</i> від <i>T. turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> , 98 – <i>Gpc-B1</i> від <i>T. aestivum</i>
6	<i>Xgwm219</i>	5'- GATGAGCGACACCTAGCCTC-3' 5'-GGGGTCCGAGTCCACAAC -3' [150]	172 – <i>Gpc-B1</i> від <i>T. aestivum</i> , 145– <i>Gpc-B1</i> від <i>T. turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i>

№	Цільовий ген, алель	Послідовність	Розмір амплікону, п.н.
7	<i>Xgwm508</i>	5'-GTTATAGTAGCATATAATGGCC -3' 5'-GTGCTGCCATGATATTT -3'[150]	139 – <i>Gpc-B1</i> від <i>T. aestivum</i> , 133 – <i>Gpc-B1</i> від <i>T. turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i>
8	<i>Xgwm193</i>	5'- CTTTGTGCACCTCTCTCTCC-3' 5'-AATTGTGTTGATGATTTGGGG -3'[170]	186 – <i>Gpc-B1</i> від <i>T. turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> , 171 – <i>Gpc-B1</i> від <i>T. aestivum</i>
Гени <i>Glu-1</i>			
9	<i>Glu-B1al</i>	5'-CCTCAGCATGCAAACATGCAGC-3' 5'-CTGAAACCTTTGGCCAGTCATGTC-3'[151]	563 – <i>Glu-B1al</i> 520 – будь-який інший алель локусу
10	<i>Glu-A1</i> – алель <i>b</i>	5'-CGAGACAATATGAGCAGCAAG-3' 5'-CTGCCATGGAGAAGTTGGA-3[152]	344 – <i>Glu-A1b</i> ; 362 – <i>Glu-A1a</i> , <i>Glu-A1c</i>
11	<i>Glu-D1</i> – гени субодиниць <i>Dx2</i> та <i>Dx5</i>	5'-GGGACAATACGAGCAGCAAA-3' 5'-CTTGTTCCGGTTGTTGCCA-3'[152]	299 – <i>Glu-D1x2</i> 281 – <i>Glu-D1x5</i>
12	<i>Glu-D1</i> – гени субодиниць <i>Dy10</i> та <i>Dy12</i>	5'-CGCAAGACAATATGAGCAAAC-3' 5'-TTGCCTTTGTCCTGTGTGC-3'[152]	397 – <i>Glu-D1y10</i> 415 – <i>Glu-D1y12</i>
Гени твердозерності			
13	<i>Pina-D1</i>	5'-CCCTGTAGAGACAAAGCTAA -3' 5'-TCACCAGTAATAGCCAATAGTG -3'[153]	290 – <i>Pina-D1a</i> , відсутність амплікону <i>Pina-D1b</i>
14	<i>Pinb-D1</i>	5'- ATGAAGACCTTATTCCTCCTA-3' 5'-TCACCAGTAATAGCCACTAGGGAA - 3'[153]	Після рестрикції MbiI: 315 – <i>Pinb-D1a</i> , 220 – <i>Pinb-D1b</i>

2.3 Методи дослідження

2.3.1 Виділення загальної ДНК з рослинного матеріалу

В якості рослинного матеріалу для виділення ДНК використовували зелену масу рослин у вигляді листків та суху масу у вигляді зернівок пшениці.

Виділення загальної ДНК проводили ЦТАБ-експрес методом, який дає можливість швидко та якісно виділити загальну ДНК. Відбирали 0,03-0,04 г

зразку і переносили у мікроцентрифужну пробірку Eppendorf на 1,5 мл. Додавали 600 мкл підігрітого до 70 °С буферу ЦТАБ (2% ЦТАБ; 1,42 М NaCl; 20 мМ EDTA; 100 мМ Tris-Cl pH 8,0; 2% PVP; 5 мМ аскорбінова кислота; 4,0 мМ DIECA (Diethyldithiocarbamic acid)). Перемішували на шейкері Eppendorf Thermomixer comfort 10 хв. До отриманої суміші додавали 500 мкл суміші хлороформ:ізоаміловий спирт (24:1). Струшували 5 хв при 500 об/хв на орбітальному шейкері Biosan TS-100. Відцентрифугувували на центрифугі Biosan Microspin 12 на 12000 об/хв 5 хв. Відбирали 200 мкл верхньої водної фази, що містить ДНК, та переносили її у чисту пробірку. Додавали 140 мкл (0,7 об'єму відібраної кількості водної фази ДНК) ізопропанолу, перемішували і залишали на 10 хв за кімнатної температури. Осаджували у мікроцентрифугі при 12000 об/хв 20 хв. Зливали супернатант і додавали 800 мкл 70 % етанолу. Ресуспендували. Відцентрифугувували 5 хв при 12000 об/хв. Обережно зливали супернатант. Осаджували 2 хв і відбирали дозатором залишки етанолу.

Висушували осад при температурі 55 °С і розчиняли ДНК у 50 мкл TE pH 8,0 (10 мМ Tris-Cl pH 8,0, 1 мМ EDTA) [154].

2.3.2 Постановка полімеразної ланцюгової реакції

Реакційна суміш складалася з наступних компонентів: специфічні праймери, 2 мкл 10×Reaction buffer B, 1,6 мкл 25 mM MgCl₂, 2 мкл розчину (60% сахароза+кризол), 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеотид-3-фосфата (Thermo Fisher Scientific), 0,15 мкл DNA Polymerase, 50-100 нг сумарної ДНК, деіонізовану воду Milli-Q до кінцевого об'єма 20 мкл. Концентрації праймерів у окремих реакціях наведена для кожної програми окремо далі. Реакції ампліфікації проходили в термоциклерах Arctic Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) та Mastercycler gradient (Eppendorf).

Для оптимізації ряду реакцій використовували техніку нисхідної ПЛР [155]. Програми ампліфікацій були наступними:

1. Мультиплексна ПЛР для виявлення гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* з використанням в якості референтного гена *actin* : денатурація за 94°C – 4 хв, 35 циклів: денатурація за 94 °C – 30 с, ренатурація за 64°C – 1 хв, елонгація за 72 °C – 1хв 40 с, завершальна елонгація за 72 °C – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції – 0,5 мкМ.
2. ПЛР нисхідна для виявлення гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* (кодомінантна система) : денатурація за 94°C – 4 хв, 10 циклів: денатурація за 94°C – 30 с, ренатурація за 65°C – 30 с (зниження температури на 1°C в кожному циклі), елонгація за 72°C – 20 с, потім 25 циклів: денатурація за 94°C – 30 с, ренатурація за 55°C – 20 с, елонгація за 72°C – 20 с; завершальна елонгація за 72°C – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції – 0,5 мкМ.
3. ПЛР для визначення локусу *Xgwm626* (кодомінантна система) : денатурація за 94°C – 4 хв, 35 циклів: денатурація за 94 °C – 30 с, ренатурація за 50°C – 30 с, елонгація за 72°C – 25 с, завершальна елонгація за 72 °C – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції – 0,5 мкМ.
4. ПЛР для визначення локусу *Xgwm219* (кодомінантна система) : денатурація за 94°C – 4 хв, 35 циклів: денатурація за 94 °C – 30 с, ренатурація за 62°C – 30 с, елонгація за 72°C – 25 с, завершальна елонгація за 72 °C – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції – 0,5 мкМ.
5. ПЛР для визначення локусу *Xgwm508* (кодомінантна система) : денатурація за 94°C – 4 хв, 35 циклів: денатурація за 94 °C – 30 с, ренатурація за 54°C – 30 с, елонгація за 72 °C – 30 с, завершальна елонгація за 72 °C – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції – 0,5 мкМ.
6. ПЛР для визначення локусу *Xgwm193* (кодомінантна система) : денатурація за 94°C – 4 хв, 35 циклів: денатурація за 94 °C – 30 с,

ренатурація за 60°C – 30 с, елонгація за 72°C – 25 с, завершальна елонгація за 72 °C – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції – 0,5 мкМ.

7. Мультиплексна ПЛР для виявлення *Glu-B1a1* з використанням в якості референтного гена *TaTM20*: денатурація за 94 °C – 3 хв, 34 цикли: денатурація за 94 °C –30 с, ренатурація за 61 °C –30 с, елонгація за 72 °C –1 хв; завершальна елонгація за 72 °C – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції для *Glu-B1* – 0,5 мкМ, для референтного гена *TaTM20* – 0,25 мкМ.
8. ПЛР для виявлення генотипів з субодиноцею *Glu-A1b* (кодомінантна система) : денатурація за 94 °C – 3 хв, 34 цикли: денатурація за 94 °C –30 с, ренатурація за 60 °C – 30 с, елонгація за 72 °C –30 с; завершальна елонгація за 72 °C – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції – 0,5 мкМ.
9. Мультиплексна ПЛР на виявлення алелів локусу *Glu-D1*: денатурація за 94 °C – 3 хв, 34 цикли: денатурація за 94 °C – 30 с, ренатурація за 61 °C – 30 с, елонгація за 72 °C –30 с; завершальна елонгація за 72 °C – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів у реакції для *Glu-D1 5* – 0,75 мкМ, для *Glu-D1 10* – 1 мкМ.
10. Мультиплексна ПЛР на виявлення алельного стану гена *Pina-D1* з використанням в якості референтного гена *TaTM20* : денатурація за 94°C – 4 хв, 34 цикли: денатурація за 94°C – 30 с, ренатурація за 60°C – 30 с, елонгація за 72°C – 40 с, завершальна елонгація за 72°C – 5 хв. Концентрація праймерів у реакції для *Pina-D1* по 0,75 мкМ, для референтного гена *TaTM20* – 0,4 мкМ.
11. ПЛР для виявлення алельного стану гена *Pinb-D1*(кодомінантна система) : денатурація за 94°C – 4 хв, 34 цикли: денатурація за 94°C – 30 с, ренатурація за 60°C – 30 с, елонгація за 72°C – 30 с, завершальна елонгація за 72°C – 5 хв. Концентрація праймерів у реакції становить по 0,5 мкМ.

2.3.3 Гідроліз продуктів ПЛР

Гідроліз ампліконів за геном *Pinb-D1* проводили ендонуклеазою MbiI (BsrBI). Суміш для гідролізу продуктів ПЛР складалася: продукти ампліфікації (10 мкл), ендонуклеаза рестрикції MbiI (BsrBI) (0,5 мкл), однократний буфер Tango (Thermo Fisher Scientific, 33 mM Tris-ацетату (pH 7,9 при 37°C); 10 mM ацетату магнію, 66 mM ацетат калію, 0,1 мг/мл БСА) і 17,5 мкл деіонізованої води Milli-Q до кінцевого об'єма 30 мкл.

Тривалість реакції гідролізу 90 хвилин за температури 37 °C. Отримані фрагменти надалі розділялися шляхом горизонтального гель-електрофорезу.

2.3.4 Електрофорез продуктів ПЛР

Продукти ПЛР розділяли в агарозному гелі з концентрацією від 1,6% до 2,5% в 1×SB-буфері (5 mM Na₂B₄O₇, pH 8,5) та 1×LB-буфері (10 mM Li₂B₄O₇, pH 8,5) [156]. Для приготування агарозної пластинки: зважують необхідну кількість агарози, переносять в термостійкий посуд і заливають 1×буфером саме таким, який знаходиться у розділючій камері. Суміш агарози і буферу нагрівають в мікрохвильовій печі до повного розчинення, а далі охолоджують до +50°C. Для візуалізації фрагментів ДНК у ході електрофорезу в агарозний розчин вносили флуоресцентний барвник – бромистий етидій, в кількості 0,5 мкг/мл. Барвник інтеркалює в ДНК, збільшуючи інтенсивність флуоресценції. Ультрафіолетове випромінювання, яке поглинається ДНК в області 260 нм, а барвником при 300 і 360 нм, спостерігається потім в червоно-оранжевій області видимого спектру (590 нм). Готовий розчин агарози заливали в горизонтально встановлену плашку, з поміщеною в неї гребінкою на необхідну кількість лунок і залишали на 30-60 хв для затвердіння агарози. Готову агарозну пластину вносять в камеру з буфером так, щоб вона повністю була покрита буфером.

Зразки ДНК в кількості 8 мкл почергово вносять в лунки гелю під електрофорезний буфер. Продукти розділяли впродовж 1-5 годин в

залежності від розмірів фрагментів і різниці в кількості пар нуклеотидів між сусідніми фрагментами. Встановлювали напругу на електродах від 3 до 7 В/см в залежності від розмірів очікуваних ампліконів.

Для визначення розміру продуктів використовували маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix GeneRuler™ (Thermo Scientific) (розмір ампліконів, п.н.: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100).

Візуалізували продукти ампліфікації в ультрафіолетовому світлі (LKB Transilluminator Macrovue 2011), документували фотосистемою Canon EOS 600D, обробляли знімки редактором GIMP, MS PowerPoint та програмою GelAnalyzer.

2.3.5 Визначення вмісту мінеральних елементів в зернівках пшениці методом ICP-MS

Аналіз проводили у відділі фізіології живлення рослин в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України. Визначення вмісту елементів у зразках зерна проводили на мас-спектрометрі з індуктивно зв'язаною плазмою ICP-MS Agilent 7700x (Agilent Technologies) з ICP-MS MassHunter WorkStation.

Зразки (0,400 г) озолювали в азотній кислоті кваліфікації ICP-grade у мікрохвильовій системі пробопідготовки Milestone Start D. Після охолодження до зразків додавали воду, коефіцієнт розчинення 250X.

Усі розчини готували на воді 1-го класу (18 Мом), підготовленої на системі очищення води Scholar-UV Nex Up 1000 (Human Corporation, Корея).

В якості калібрувальних стандартів у 2015 році використовували Fluka Multielement standard solution 5 for ICP (Швейцарія), а у 2016 р. – ICP-MS Complete Standard IV-ICPMS-71A (Inorganic Ventures, USA), що дозволило визначити також Se. Налаштування мас-спектрометра наведено у табл. 2.2.

Таблиця 2.2. Основні налаштування мас-спектрометра Agilent 7700x для аналізу неорганічних елементів.

Показник	Параметри	Значення
Живлення	Потужність генератора, W	1550
Налаштування аргонної плазми	Потік газу-носія, л/хв.	15,5
	Потік гелію, л/хв.	0,1
Автоналаштування	CeO ⁺ /Ce ⁺ (%)	1,114
	Ce ⁺ /Ce ⁺ (%)	1,867
	Чутливість, імпульсів за секунду до мг/л	Li (62700), Y (92920), Tl (87080)

В аргонній плазмі вибрані елементи можуть утворювати хибні піки. Наприклад, рівні за масою CaO⁵⁶ та Fe⁵⁶, чи ArN або ArO з іншими ізотопами заліза. ArNH та KO можуть маскувати Mn, а Ba⁺⁺ – Zn. Усі 6 ізотопів Ca можуть взаємодіяти з O, H та Ar, що призводить до неточностей у визначенні Cu, Fe, Sc, Se. Більшість ізотопів селену схильні до перешкод від ізобаричного перекриття Kr або Ge (маси 74, 76, 78, 80 і 82) або багатоатомних інтерференцій, головним чином, Ar₂ щодо мас 76, 78, 80. Хоча мідь добре іонізує в аргонній плазмі (90%), визначення ізотопу 63 Cu ускладнюється взаємодією NaAr та видами P, а 65 Cu перекривається SO₂/SO₂H; також ізотопи міді інтерферують з оксидами кальцію та титану.

Тому визначення проводили у режимі продувки гелієм, що ефективно видаляє згадані матричні та елементні інтерференції. А в якості внутрішнього стандарту використовували 1 ppb розчин Sc фірми Inorganic Ventures, USA.

Обробку результатів проводили в програмному забезпеченні ICP-MS MassHunter Software та MS Excel 2014.

2.3.6 Визначення якісних показників пшениці методом інфрачервоної спектроскопії

Аналіз проводили у лабораторії якості зерна в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України. Загальний вміст білка та дослідження фізичних показників твердозерності проводили методом інфрачервоної спектроскопії (NIR). Метод інфрачервоної спектрометрії (NIR) оснований на відбитті у ближньому інфрачервоному випромінюванні діапазону хвиль довжинами 500–2300 нм і наступному порівнянні отриманого спектру з результатами бази даних калібрувань. Зерно вагою 50 г розмелювали на лабораторному млині Perten LM 3100 (Швеція). Показники твердозерності та загально білка у борошні пшениці визначали на приладі Perten Informatic 8600 (Швеція).

2.3.7 Визначення загального азоту методом К'єльдаля

Контроль зразків проводили у відділі фізіології живлення рослин в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України. Визначення загального азоту проводили методом К'єльдаля, який складався з трьох етапів – мінералізація, нейтралізація і титрування. Відбиралася наважка зерна 0,8000 г, переносилася в колбу на 250 см³ додавалось 2 таблетки Kjeltabs СК (кожна таблетка містить K₂SO₄ 3,5 г та CuSO₄*5H₂O 0,4 г) і 15 мл концентрованої сірчаної кислоти. Процес мінералізації проходив на приладі Labor Technik InKjel D-40599 (Німеччина) протягом 90 хв. Для наступного етапу, відгонки аміаку, в пробірку автоматично додавали 20 см³ бідистильованої води і 20 см³ 40% NaOH. Відігнаний аміак поглинався 4% борною кислотою. Нагрівання і відгонка аміаку тривала 5 хв. Процес проходив автоматично на приладі Kjeldahl digester Behr Labor Technik_SR3i (Німеччина). Третій етап титрування проходив на цифровому титраторі TitroLine (Німеччина). Процес титрування проводився 0,1Н H₂SO₄ і тривав до зниження рН до 4,8. Прилад виводив результат кількості загального азоту в пробі. Для переведення

загального азоту в кількість загального білка використовували коефіцієнт переведення, який для пшениці складає 5,7 згідно ГОСТ 10846-91.

2.3.8 Визначення індексу седиментації за методом *SDS-30*

Не пряму оцінку «сили» борошна, тобто визначення індексу седиментації за методом *SDS-30* (*SDS* – додецил сульфат натрія) здійснювали на автоматичному приладі з програмним управлінням. Прилад розроблений в Селекційно-генетичному інституті Національного центра насіннєзнавства та сортовивчення УААН. Для цього відбирали середню пробу борошна масою 3,2 г в поліпропіленові стаканчики та заливали його 10 мл 4%-ої оцтової кислоти. Кожен стаканчик закривають кришечкою та інтенсивно струшували його вміст 4-5 рази для отримання однорідної суспензії. Після чого, стаканчики поміщали у попередньо прогріту до 30°C водяну баню і відстоювали рівно 30 хвилин. Тим часом готували розчини: 2%-ний розчин додецилсульфату натрію та 4%-ий розчин оцтової кислоти із додаванням метилену синього. Стаканчики через 30 хвилин виймають з бані, поміщають у лабораторний штатив і додають у кожний стакан по 20 мл 4% розчину льодяної оцтової кислоти, збовтують і виливають в 100 см³ циліндри ротаційного приладу. Цим же розчином споліскують кожний стаканчик, переливають залишок в циліндр і доводять до мітки 50 см³. Дають суспензії в циліндрах 2 хв. відстоятися. Циліндри в блок-пакеті ротаційного приладу закривають загальною кришкою і плавно обертають блок-пакет навкруг горизонтальної осі 5 разів. Дають суспензії 5 хв. відстоятися. Циліндри відкривають і повільно додають 2% розчин додецил сульфату натрію до мітки 100 см³. Циліндри в блок-пакеті закривають суцільною кришкою і блок-пакет поміщають на автоматичний ротаційний пристрій, фіксують його і запускають програму циклів обертання, через 16 хвилин (3 кругові оберти приладу) знімають показники [157].

2.3.9 Статистична обробка даних

Частоту рекомбінації обраховували згідно методики, що наведена в посібнику з генетичного аналізу рослин [158].

Статистичний аналіз впливу алелів генів *Pina-D1* та *Pinb-D1* на твердозерність проводили за допомогою стандартних функцій програмного оточення для мови програмування R версії 3.3.2, що реалізують тест Уїлкоксона-Манна-Уїтні [159] та критерій Краскела-Уолліса [160].

Статистичний аналіз даних з визначення вмісту білка проводили за *t* - критерієм Стюдента за порівняння середніх величин, що використовується для перевірки рівності середніх значень у двох вибірках [161].

Висновки до розділу 2

Системи молекулярно-генетичних ДНК маркерів є сучасними методами аналізу генетичного матеріалу рослинного походження. Вони дають можливість при невеликій кількості дослідного матеріалу отримувати результати надзвичайної точності.

У комплексі методів роботи та аналізу даних були підібрані ефективні, адекватні, сучасні, високотехнологічні. Застосовувалися новітні матеріали, деякі з яких були отримані з інших країн. Підходи використані в експериментальній частині дисертаційної роботи дають можливість визначити алельний стан генів, вміст мікро- та макроелементів, вміст білка, твердість зернівок, хлібопекарську якість борошна та врожайність дослідних ліній.

РОЗДІЛ 3. СИСТЕМИ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ЛІНІЙ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ З ГЕНОМ *Gpc-B1* ВІД *TRITICUM TURGIDUM* SSP. *DICOCCOIDES*

3.1 Розробка молекулярних-генетичних систем ДНК – маркерів для визначення гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*

Зразки м'якої пшениці – носії гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, з якими ми працювали, були отримані в результаті віддаленого схрещування м'якої пшениці сорту Куяльник, який відноситься до сильних та високопродуктивних сортів та гексаплоїдної лінії пшениці Glupro, яка містить 6В хромосому від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*. Лінія Glupro виступає донором гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Для перевірки наявності цільового гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в зразках пшениці, отриманих від схрещування, було обрано праймери запропоновані в статті [146].

Обрана система праймерів домінантна, тобто дає можливість визначити наявність або відсутність гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, але не дає можливості визначити гетерогенність гена. Для внутрішнього контролю реакції було використано пару праймерів до референтного гена пшениці *actin* [148]. Оптимізацію мультиплексної ПЛР проводили за допомогою градієнтної ПЛР для підбору оптимальних температур і часу окремих стадій процесу та шляхом вибору оптимальних концентрацій праймерів у реакції.

В процесі оптимізації було визначено, що оптимальне співвідношення праймерів, для мультиплексної реакції має бути 0,5 мкМ. Розділення продуктів ампліфікації проводили за допомогою електрофорезу в агарозному гелі концентрацією 1,5% з використанням бромистого етидію в якості барвника.

Результати типової мультиплексної ампліфікації з домінантною системою праймерів на ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* представлено на рис. 3.1.

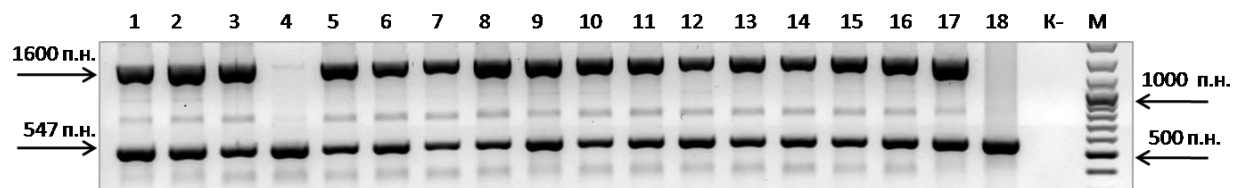


Рис. 3.1 Електрофореграма результатів мультиплексної ПЛР на наявність гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* та референтного гена *actin*. Доріжки 1-16 – зразки популяції пшениці F₂ покоління; 17 – лінія Glupro, донор гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*; 18 – сорт пшениці Куяльник; К- – негативний контроль без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Очікуваний амплікон для цільового гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* відповідає довжині 1600 п.н., тоді як референтний ген, має фрагмент на довжині 547 п.н.

Відсутність амплікону на доріжці №4 довжиною 1600 п.н. свідчить про відсутність гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в дослідному зразку. Наявність амплікону довжиною 547 п.н. свідчить про наявність загальної ДНК в зразку і адекватного перебігу ПЛР.

Розроблена молекулярно - генетична система дає можливість визначити лише наявність гена, але не його алельний стан. Для селекційного процесу важливе значення має алельний стан гена, так як гомозиготний алельний стан свідчить про стабільність гена і передачу його наступним поколінням, тоді як гетерозиготний стан навпаки, не гарантує передачу цільового гена наступним поколінням. Хоча розроблена молекулярно-генетична система має недолік, але на перших етапах відбору зразків, дає

можливість відбракувати сім'ї, які взагалі не є носіями гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Для визначення стану алеля гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, була розроблена кодомінантна молекулярно-генетична система маркерів, що дає можливості визначити, наявність активного алеля гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* і наявність не активного алеля від *T.aestivum*.

Продукти ампліфікації візуалізували після їх електрофоретичного розділення в 2,5%-му агарозному гелі в ультрафіолетовому світлі із залученням бромистого етидію, як фарбувального реагенту.

Результат типової електрофореграми ПЛР з кодомінантною системою праймерів на ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* представлено на рис. 3.2.

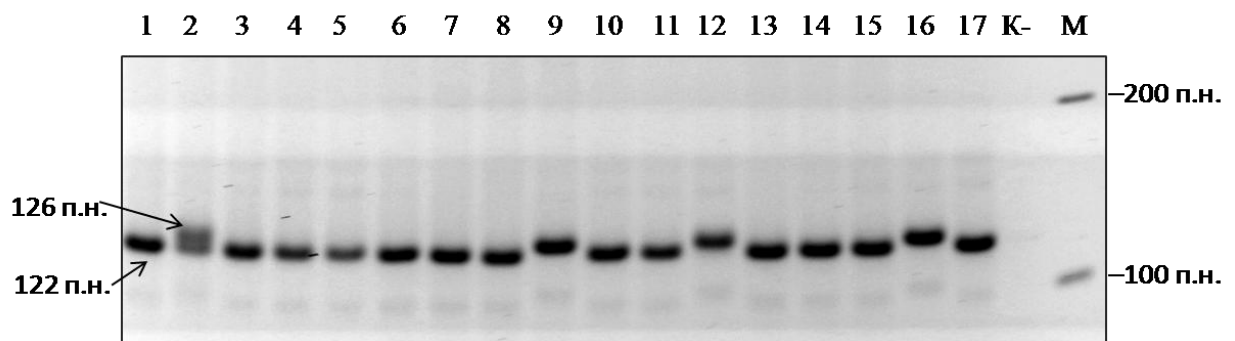


Рис. 3.2 Електрофореграма результатів ПЛР на наявність гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Доріжки 1-15 – зразки популяції пшениці F₅ покоління; 16 – сорт пшениці Куяльник; 17 – лінія Glupro, донор гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*; К- – негативний контроль без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Амплікон 122 п.н. свідчить про алель гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, ампікон 126 п.н. – вказує про наявність не активного алеля від *T. aestivum*. На доріжці №2 присутні два амплікони довжиною 122 п.н. і 126 п.н., що свідчить про гетерозиготний стан гена.

Дана кодомінантна молекулярно - генетична система є більш досконалою і дає можливість на більш ранньому етапі вібракувати зразки, що не несуть цільовий ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, а також мають гетерозиготний алельний стан гена *Gpc-B1*.

3.2 Скринінг поколінь рослин пшениці – носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, за допомогою підібраних систем ДНК-маркерів

Розробленими ДНК – маркерними системами, було перевірено чотири покоління зразків популяції пшениці, починаючи з F₂ і закінчуючи F₅.

Зразки пшениці, покоління F₂ були отримані від схрещування сорту Куяльник та донора гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* і були проаналізовані домінантною молекулярно-генетичною системою маркерів. Покоління F₂ було представлене 160 зразками у вигляді зеленої маси рослин. Покоління зразків F₃ було представлене 99 зразками у вигляді зеленої маси рослин. З зібраних зразків було виділено ДНК і проведена полімеразно ланцюгова реакція з парою праймерів [146]. Результати аналізу зразків F₂ і F₃ покоління наведено в табл. 3.1.

Таблиця 3.1 Результати перевірки F₂, F₃ покоління пшениці на наявність гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*.

№ Зразків	Наявність гена <i>Gpc-B1</i> , F ₂	Наявність гена <i>Gpc-B1</i> , F ₃	№ Зразків	Наявність гена <i>Gpc-B1</i> , F ₂	Наявність гена <i>Gpc-B1</i> , F ₃
1.	-	-	81.	+	+
2.	-	-	82.	+	+
3.	-	-	83.	+	+
4.	-	-	84.	+	+
5.	-	-	85.	-	-
6.	-	-	86.	+	+
7.	-	-	87.	+	+
8.	-	-	88.	-	-

№ Зразків	Наявність гена <i>Grc-B1</i> , F ₂	Наявність гена <i>Grc-B1</i> , F ₃	№ Зразків	Наявність гена <i>Grc-B1</i> , F ₂	Наявність гена <i>Grc-B1</i> , F ₃
9.	-	-	89.	-	-
10.	-	-	90.	-	-
11.	-	-	91.	+	+
12.	-	-	92.	+	+
13.	-	-	93.	-	-
14.	-	-	94.	+	-
15.	-	-	95.	+	+
16.	-	-	96.	+	+
17.	-	-	97.	+	+
18.	+	+	98.	+	+
19.	-	-	99.	+	+
20.	-	-	100.	-	-
21.	-	-	101.	-	-
22.	-	-	102.	+	+
23.	-	-	103.	+	+
24.	-	-	104.	+	+
25.	+	+	105.	+	+
26.	-	-	106.	+	+
27.	+	+	107.	+	+
28.	+	+	108.	+	+
29.	-	-	109.	+	+
30.	+	+	110.	+	+
31.	-	-	111.	+	+
32.	-	-	112.	+	+
33.	+	+	113.	+	+
34.	-	-	114.	+	+
35.	-	-	115.	+	-
36.	+	+	116.	+	+
37.	-	-	117.	+	+
38.	-	-	118.	+	+
39.	-	-	119.	+	+
40.	-	-	120.	+	+
41.	-	-	121.	+	+
42.	-	-	122.	+	+
43.	-	-	123.	+	-
44.	+	-	124.	+	+
45.	+	+	125.	+	+
46.	+	+	126.	+	-
47.	+	-	127.	-	-
48.	+	+	128.	+	+

№ Зразків	Наявність гена <i>Gpc-B1</i> , F ₂	Наявність гена <i>Gpc-B1</i> , F ₃	№ Зразків	Наявність гена <i>Gpc-B1</i> , F ₂	Наявність гена <i>Gpc-B1</i> , F ₃
49.	+	+	129.	-	-
50.	+	-	130.	-	-
51.	+	+	131.	-	-
52.	+	+	132.	-	-
53.	+	+	133.	-	-
54.	+	-	134.	-	-
55.	+	-	135.	-	-
56.	+	-	136.	-	-
57.	+	+	137.	-	-
58.	+	-	138.	-	-
59.	+	+	139.	+	+
60.	+	+	140.	+	+
61.	+	+	141.	+	+
62.	+	+	142.	+	+
63.	+	+	143.	-	-
64.	+	+	144.	-	-
65.	+	+	145.	-	-
66.	+	-	146.	+	+
67.	+	+	147.	+	-
68.	+	+	148.	+	-
69.	+	+	149.	+	+
70.	-	-	150.	+	+
71.	-	-	151.	+	-
72.	+	+	152.	+	-
73.	+	-	153.	+	+
74.	+	+	154.	+	+
75.	+	+	155.	+	-
76.	+	+	156.	-	-
77.	+	+	157.	+	+
78.	+	+	158.	+	+
79.	+	+	159.	+	+
80.	+	+	160.	-	-

Примітка: «+» - наявність гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*;
«-» - наявність гена *Gpc-B1* від *T. aestivum*.

З зібраних 160 зразків пшениці F₂ покоління, 99 зразків мали позитивну реакцію на ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, а 61 зразок містив неактивний ген від *T. aestivum*. Зразки, що мали ген *Gpc-B1* від *T. turgidum*

ssp. dicoccoides, були відібрані та висаджені в ґрунт на наступний рік для отримання F_3 покоління.

Аналіз F_3 покоління проводили аналогічно до F_2 покоління. В таб. 3.1 наведено результати цього аналізу. З 99 відібраних зразків пшениці ген *Gpc-B1* від *T. turgidum ssp. dicoccoides* містив 81 зразок.

Зразки F_3 покоління, що мали найкращі фенотипові показники і містили цільовий ген *Gpc-B1* від *T. turgidum ssp. dicoccoides*, були висаджені в ґрунт на наступний рік для отримання F_4 покоління.

З зразків пшениці покоління F_4 , за фенотиповими показниками, а також за масою зерен з одного колоса, було відібрано 90 найкращих колосів, вимолочено та висаджено в ґрунт, зерно кожного колоса в окремий рядок. Відібрані 90 колосів, кожен окремо було перевірено розробленою кодомінантною системою молекулярно-генетичних маркерів на наявність гена *Gpc-B1* від *T. turgidum ssp. dicoccoides*.

Зібране F_5 покоління пшениці було перевірене кодомінантною системою молекулярно-генетичних маркерів на наявність гена *Gpc-B1* від *T. turgidum ssp. dicoccoides* з суміші 5 зерен з різних колосів, що дає нам можливість стверджувати, що зразки, які мали позитивний гомозиготний стан гена *Gpc-B1* від *T. turgidum ssp. dicoccoides*, можуть називатися лініями. Результати перевірки на ген *Gpc-B1* від *T. turgidum ssp. dicoccoides* зразків F_4 , F_5 поколінь пшениці представлені в табл. 3.2.

Таблиця 3.2 Результати перевірки F_4 , F_5 покоління пшениці на наявність гена *Gpc-B1* від *T. turgidum ssp. dicoccoides*.

№ Зразків, F_4	Наявні-сть гена <i>Gpc-B1</i> , F_4	№ Зразків, F_5	Наявні-сть гена <i>Gpc-B1</i> , F_5	№ Зразків, F_4	Наявні-сть гена <i>Gpc-B1</i> , F_4	№ Зразків, F_5	Наявні-сть гена <i>Gpc-B1</i> , F_5
18.2	+	1	+	75.1	+	46	+
18.3	+	2	+	75.4	+	47	+/-
25.3	+/-	3	+/-	76.1	+/-	48	-
25.4	+/-	4	-	76.2	+/-	49	+/-

№ Зразків, F ₄	Наявні- сть гена <i>Gprc-B1</i> , F ₄	№ Зразків, F ₅	Наявні- сть гена <i>Gprc-B1</i> , F ₅	№ Зразків, F ₄	Наявні- сть гена <i>Gprc-B1</i> , F ₄	№ Зразків, F ₅	Наявні- сть гена <i>Gprc-B1</i> , F ₅
27.1	+	5	+	78.1	+	50	+
27.4	+	6	+/-	78.3	+	51	+
28.2	+	7	+	80.3	+	52	-
30.4	+	8	+	81.3	+/-	53	+/-
33.3	+	9	+	81.5	+/-	54	+/-
33.5	+	10	+	82.1	+	55	+/-
36.2	+	11	+	82.2	+	56	+
36.5	+	12	+	83.3	+	57	+/-
44.3	-	13	-	83.5	+	58	+
46.1	+	14	+	84.3	+/-	59	-
46.2	+	15	+	86.1	+	60	+
47.3	+/-	16	-	87.5	-	61	-
49.2	+	17	+	91.9	+/-	62	+
49.5	+	18	+	91.2	+/-	63	+/-
50.5	+	19	+	94.4	+	64	+
51.3	+	20	+	94.5	+	65	+/-
51.5	+	21	+	98.3	+	66	+
52.3	+/-	22	+/-	104.1	-	67	+
53.1	+	23	+/-	104.3	-	68	+
53.4	+	24	+/-	104.5	+	69	+/-
54.4	-	25	-	110.3	+	70	-
55.1	-	26	-	111.4	+	71	+/-
56.3	-	27	-	113.3	+	72	-
56.4	-	28	-	114.4	-	73	-
57.4	+/-	29	-	115.2	-	74	-
60.4	+	30	+	120.1	+	75	+
61.1	+/-	31	-	120.5	+	76	+
62.4	-	32	-	122.2	+/-	77	+/-
63.4	+/-	33	-	122.5	+/-	78	+/-
64.1	+/-	34	+/-	123.2	-	79	-
65.2	+	35	+	125.2	+	80	+
65.5	+	36	+	125.5	+	81	+
66.3	-	37	-	149.5	+/-	82	+/-
67.1	+	38	+	150.2	+/-	83	-

№ Зразків, F ₄	Наявні- сть гена <i>Gpc-B1</i> , F ₄	№ Зразків, F ₅	Наявні- сть гена <i>Gpc-B1</i> , F ₅	№ Зразків, F ₄	Наявні- сть гена <i>Gpc-B1</i> , F ₄	№ Зразків, F ₅	Наявні- сть гена <i>Gpc-B1</i> , F ₅
67.2	+	39	+	150.4	+/-	84	+
68.1	+	40	+	157.1	+	85	-
68.5	+	41	+	157.2	+	86	+
72.3	+	42	+	158.4	+	87	-
73.2	-	43	-	158.5	+	88	-
74.1	+	44	+	159.1	+	89	-
74.2	+	45	+	159.5	+	90	-

Примітка: «+» - алель гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*; «-» - алель гена *Gpc-B1* від *T. aestivum*; «+/-» - гетерозиготний стан гена *Gpc-B1*.

Перевірка поколінь пшениці на цільовий ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* – дуже важливий етап у роботі. Від точності перевірки цього аналізу залежав подальший відбір цінних ліній і додаткові аналізи, що проводилися над лініями.

Покоління F₅ ліній пшениці було перевірено на наявність гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* з 90 зразків, 44 з них були гомозиготними за геном *Gpc-B1*, 18 — гетерозиготні за геном *Gpc-B1*, 28 — не містили ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Основна увага нових напрямків досліджень була націлена саме на лінії, що є позитивними гомозиготними за геном *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, так як вони є перспективним генетичним матеріалом, для подальших селекційних робіт.

3.3 Розробка кодомінантних систем мікросателітних маркерів до локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*

Донором гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* для зразків популяції була гексаплоїдна лінія пшениці Glupro, яка містить 6В хромосому від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*. На 6В хромосомі м'якої пшениці локалізовані

ряд важливих генів, що відповідають за безостість-остистість, субодиниці гліадина, антоціановий колір колеоптиля, відновлення фертильності при цитоплазматичній чоловічій стерильності, стійкість до борошнистої роси, бурої іржі і стеблової іржі [162]. Тому для дослідних ліній було важливо, щоб ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* був присутній на 6В хромосомі, а вся інша частина 6В хромосоми була замінена на 6В хромосому культурної м'якої пшениці *T. aestivum* сорту Куяльник.

Геноми всіх еукаріотів містять певний клас послідовностей, які називаються мікросателітами або іншими словами прості повторювані послідовності (SSR) [163]. На основі цих коротких повторів ДНК довжиною від 2 до 6 п.н. створено мікросателітні або SSR молекулярні маркери. Мікросателіти гіперваріабельні, вони часто мають десятки алелей по одному локусу, відрізняються один від одного по кількості повторів. Мікросателітні маркери мають великий потенціал для використання їх в еволюційних дослідженнях та дослідженнях, що стосуються генетичних зв'язків [164].

Для встановлення факту рекомбінації на 6В хромосомі дослідних сімей пшениці носіїв гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, було розроблено 4 кодомінантних системи ДНК молекулярно-генетичних маркерів, до SSR локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*. Розміщення локусів на хромосомі 6В зображено на рис. 3.3.

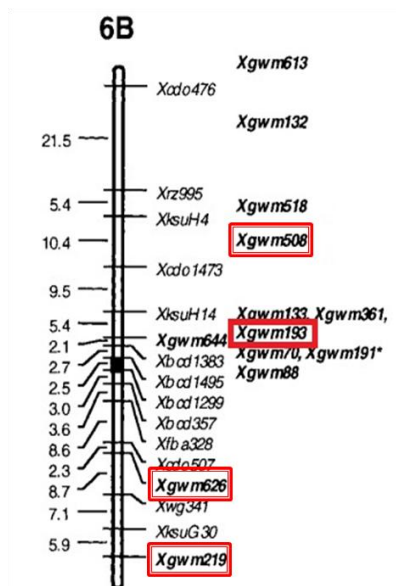


Рис. 3.3 Розміщення локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219* на 6В хромосомі.

SSR локус *Xgwm508* розміщений на довгому плечі 6В хромосоми. Для розробки кодомінантної системи було використано пару праймерів [150]. Оптимізацію умов проходження ПЛР проводили за допомогою градієнта температур, що дало можливість підібрати оптимальні умови роботи праймерів. Продукти ампліфікації візуалізували після їх електрофоретичного розділення у 2,5%-му агарозному гелі в ультрафіолетовому світлі із залученням 0,5 мкг/мл бромистого етидію як фарбувального реагенту. Крім того, недивлячись на незначну відмінність у розмірах ампліконів на цільовий ген (6 п.н.) ефективне розділення їх є можливим у 2,5 % агарозному гелі, що підвищує загальну ефективність, рентабельність системи та заощаджує час у порівнянні з використанням ПААГ.

Результат типової електрофореграми продуктів ПЛР на локус *Xgwm508* зображено на рис. 3.4.

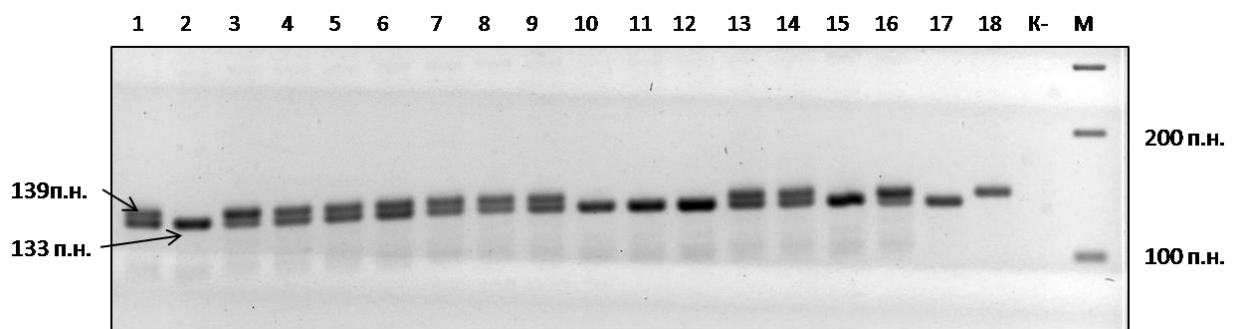


Рис. 3.4 Електрофореграма результатів ПЛР на локус *Xgwm508*. Доріжка 1-16 – зразки популяції пшениці F_3 покоління; 17 – лінія Glupro, донор гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*; 18 – сорт пшениці Куяльник; К- – негативний контроль без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Амплікон на довжині 133 п.н. свідчить про наявність локусу *Xgwm508* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, амплікон на довжині 139 п.н. свідчить, що досліджуваний локус *Xgwm508* від *T. aestivum*. Присутність двох ампліконів, як наприклад на доріжці №1, свідчить про гетерозиготність

локусу, тобто наявність двох алелей і від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* і від *T. aestivum*. Цінними зразками при перевірці за даною реакцією є сім'ї, що мали локус *Xgwm508* від *T. aestivum*, так як це свідчить, що фрагмент хромосоми на якому розташований досліджуваний локус, який вже наявний від культурної м'якої пшениці *T. aestivum*.

SSR локус *Xgwm193* розміщений на довгому плечі хромосоми 6В. Кодомінантна система молекулярно-генетичних ДНК – маркерів, для ідентифікації локуса *Xgwm193*, використано пару праймерів *Xgwm193R* та *Xgwm193F* [150]. Розділення продуктів ампліфікації проводили в 2% агарозному гелі, із залученням бромистого етидію як фарбувального реагенту для ультрафіолетового світла.

Результат типової електрофореграми продуктів ПЛР на локус *Xgwm193* зображено на рис. 3.5.

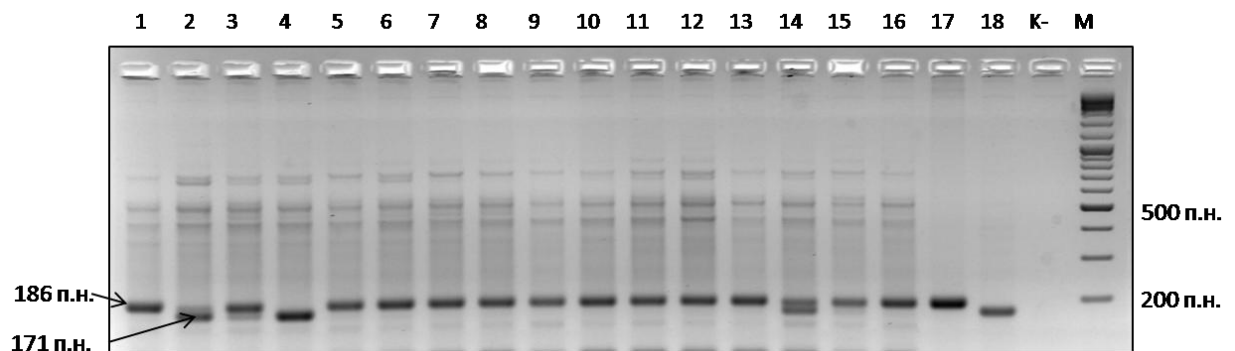


Рис. 3.5 Електрофореграма результатів ПЛР на локус *Xgwm193*. Доріжка 1-16 – зразки популяції пшениці F_3 покоління; 17 – лінія Glupro, донор гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*; 18 – сорт пшениці Кузяльник; К- – негативний контроль без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Амплікон на довжині 171 п.н. свідчить про наявність локусу *Xgwm193* від *T. aestivum* ; амплікон на довжині 186 п.н вказує на наявність локусу від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*. Присутність двох ампліконів, як на доріжці №14,

вказує на те що локус *Xgwm193* є гетерозиготним. Цінними зразками в даному аналізі, являються зразки, в яких локус *Xgwm193* від *T. aestivum*, саме ці зразки матимуть цінні ознаки, що розміщені на цій ділянці хромосоми від культурного і продуктивного сорту Куяльник.

SSR локус *Xgwm626* розміщений на короткому плечі 6В хромосоми. Для розробки кодомінантної системи маркерів було використано пару праймерів, що наведені в статті [150]. Продукти ампліфікації візуалізували після їх електрофоретичного розділення у 1,6%-му агарозному гелі в ультрафіолетовому світлі із залученням бромистого етидію як фарбувального реагенту.

Результат типової електрофореграми продуктів ПЛР на локус *Xgwm626* зображено на рис. 3.6.

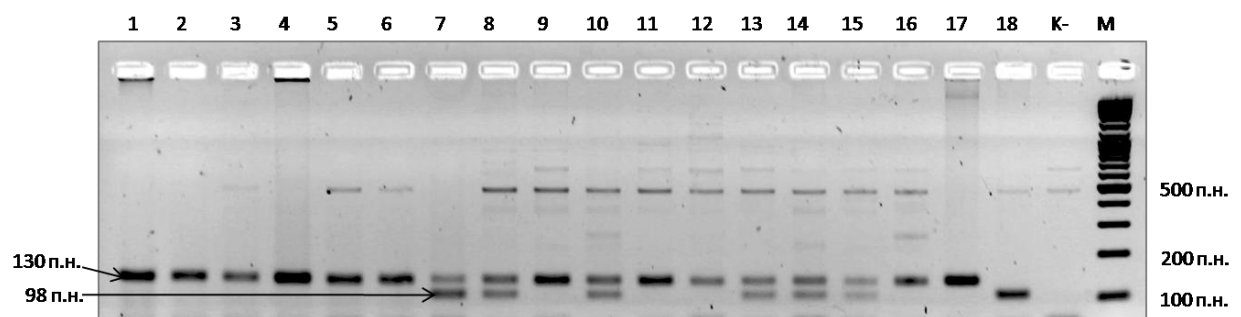


Рис. 3.6 Електрофореграма результатів ПЛР на локус *Xgwm626*. Доріжка 1-16 – зразки популяції пшениці F₃ покоління; 17 – лінія Glupro, донор гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*; 18 – сорт пшениці Куяльник; К- – негативний контроль без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Амплікон на довжині 98 п.н. свідчить про наявність локуса *Xgwm626* від *T. aestivum*, тоді як амплікон на довжині 130 п.н. свідчить про наявність локуса *Xgwm626* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Присутність двох ампліконів на довжині 98 п.н. та 130 п.н свідчить про гетерозиготність

локусу *Xgwm626*. Як і для попередніх локусів, для нас найбільшу цінність несуть зразки у яких локус *Xgwm626* від *T. aestivum*.

SSR локус *Xgwm219* розміщений на короткому плечі 6В хромосоми. Для розробки кодомінантної системи ДНК молекулярно-генетичних маркерів з визначення локусу *Xgwm219* були використані праймери *Xgwm219F*, *Xgwm219R* [150]. Продукти полімеразно ланцюгової реакції розділяли в 1,6% агарозному гелі, в якості барвника використовували бромистий етидій.

Результат типової електрофореграми ПЛР на локус *Xgwm219* зображено на рис. 3.7.

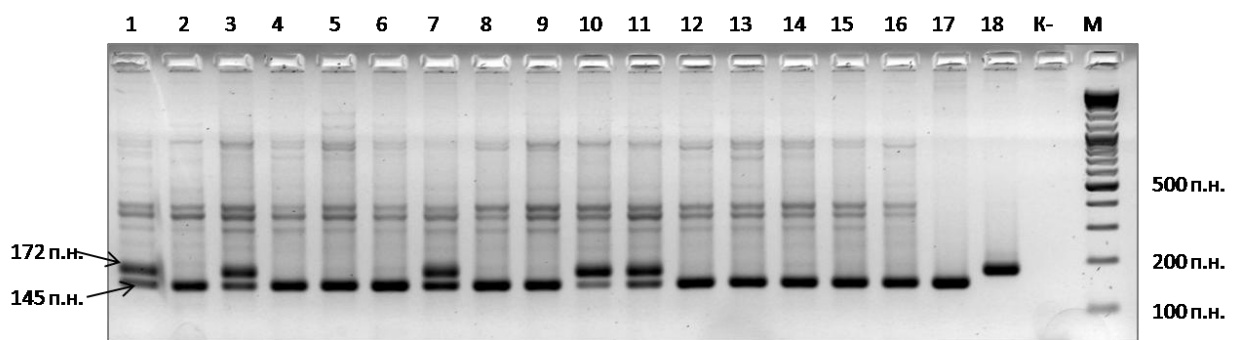


Рис. 3.7 Електрофореграма результатів ПЛР на наявність локусу *Xgwm219*. Доріжка 1-16 – зразки популяції пшениці F_3 покоління; 17 – лінія Glupro, донор гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*; 18 – сорт пшениці Куяльник; К- – негативний контроль без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Амплікон на довжині 145 п.н. свідчить про наявність локусу *Xgwm219* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, тоді як амплікон на довжині 172 п.н. свідчить про те що локус *Xgwm219* від *T. aestivum*. Наявність двох фрагментів на доріжці, наприклад, як на доріжці №1, свідчить про гетерозиготний стан локусу *Xgwm219*. За результатами перевірки за локусом *Xgwm219* цінність несуть зразки, що несуть локус від *T. aestivum*.

SSR локуси *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219* розміщені рівномірно по 6В хромосомі, що дає нам можливість відслідкувати процес

рекомбінації на майже всій довжині хромосоми. В процесі оптимізації умов реакції було визначено оптимальні температури ренатурації праймерів шляхом використання градієнтної ПЛР. Розроблені ПЛР для локусів дозволяють з високою надійністю диференціювати зразки популяції, завдяки тому, що вони базуються, як вже зазначалося, на кодомінантній ідентифікації алелів. Розроблені молекулярно-генетичні системи є зручними, ефективними і досить прості у використанні.

3.4 Аналіз рослин пшениці F₃ покоління носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* по підібраним SSR локусам

З використанням розроблених біотехнологічних систем до локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219* нами був проведений аналіз вибірки зразків рослин пшениці F₃ покоління, що попередньо були перевірені на наявність гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* з метою виявлення цінних зразків з певною генетичною комбінацією локусів, а також визначення частоти рекомбінації за локусами *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*. Результати перевірки представлені у табл. 3.3.

Таблиця 3.3 Результати аналізу F₃ покоління зразків популяції пшениці на наявність локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*

№ Зразків	Локус <i>Xgwm508</i>	Локус <i>Xgwm193</i>	Локус <i>Xgwm219</i>	Локус <i>Xgwm626</i>
18	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
25	<i>T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.d</i>
27	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>
28	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
30	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>
33	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>
36	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
45	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
46	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
48	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
49	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>

№ Зразків	Локус <i>Xgwm508</i>	Локус <i>Xgwm193</i>	Локус <i>Xgwm219</i>	Локус <i>Xgwm626</i>
51	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
52	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
53	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
57	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.a</i>
59	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
60	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>
61	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>
62	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
63	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
64	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
65	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
67	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>
68	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.a</i>
69	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
72	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.d</i>
74	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
75	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.d</i>
76	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
77	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
78	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
79	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
80	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
81	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
82	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
83	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
84	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
86	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
87	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
91	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
92	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
95	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
96	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
97	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
98	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
99	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
102	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
103	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
104	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
105	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
106	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
107	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>

№ Зразків	Локус <i>Xgwm508</i>	Локус <i>Xgwm193</i>	Локус <i>Xgwm219</i>	Локус <i>Xgwm626</i>
108	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
109	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
110	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
111	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
112	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
113	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
114	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
116	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
117	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
118	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
119	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
120	<i>T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>
121	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
122	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.a</i>	<i>T.d</i>
124	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
125	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>
128	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
139	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
140	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
141	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
142	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
146	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
149	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
150	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
153	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
154	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
157	<i>T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
158	<i>T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.a</i>
159	<i>T.d</i>	<i>T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.a</i>

Примітка: *T.d* - алель локусу від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*; *T.a* - алель локусу від *T. aestivum*; *T.d/T.a* – гетерозиготний стан локуса, наявність алелей від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* і від *T. aestivum*.

Розробленими молекулярно-генетичними системами для SSR локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219* було перевірено 81 зразок пшениці F₃ покоління.

Дослідження кросинговеру хромосоми 6В за допомогою дослідження поліморфізму SSR локусів, які були розміщені на різних плечах хромосоми, дозволило оцінити можливість отримання ліній пшениці, які б несли хромосому 6В пшениці від сорту Куяльник з невеликою ділянкою, що містить ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*. Це дозволить об'єднати у нових сортах пшениці високі хлібопекарські показники якості сорту Куяльник разом з підвищеним вмістом білка та мікроелементів, що детермінується активним геном *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*. Найбільшу цінність для нас представляли зразки, які мали ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, але одночасно містили алелі всіх SSR локусів від *T. aestivum* L.

Загалом спостерігали:

наявність алеля локусу *Xgwm 508* від *T. aestivum* L. у зразках популяції №25, №120, №157 та №158;

наявність алеля локусу *Xgwm 193* від *T. aestivum* L. у зразках популяції №25, №28, №63, №158 та №159;

наявність алеля локусу *Xgwm 626* від *T. aestivum* L. у зразках популяції №57, №68, №158 та №159;

наявність алеля локусу *Xgwm 219* від *T. aestivum* L. у зразках популяції №25, №72, №75, №83, №122, №158 та №159.

Велика кількість зразків була у гетерозиготному стані по вибраним локусам. А саме з 81 сімей, по локусу *Xgwm508* - 27, по локусу *Xgwm193* – 31, по локусу *Xgwm219* – 32, і по локусу *Xgwm 626* – 28, що також є позитивним результатом, у порівнянні з сім'ями, що містили алелі локусів лише від *T.turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Особливу увагу слід приділити зразкам №158, у якої всі 4 SSR локуси були виявлені від сорту Куяльник (*T. aestivum*).

Отримані дані, дають можливість прослідкувати процес проходження кросинговеру на 6В хромосомі і надають результати для відбору дослідних

сімей не лише за фенотиповими показниками, а й за генетипом, що є значно достовірніше і правильніше.

3.5 Визначення частоти рекомбінації по локусам *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*

Для оцінки частоти рекомбінації за даними покоління F_3 використовували наступні формули:

$$P = \frac{(a + b)}{[2 * (c + b)]} * 100\%,$$

де P – частота рекомбінації; a і b сума відповідних гомозиготних рекомбінантних класів; c і b не рекомбінантні (батьківські) гомозиготні класи.

Похибку частоти рекомбінації (S_p) обраховували, за наступною формулою:

$$S_p = (1 + 2 * p) * \sqrt{(p/2n)},$$

де n – кількість вибірки; p – частота рекомбінації.

Використовуючи вище наведені формули, розраховували частоту рекомбінації та похибку частоти рекомбінації для SSR локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*.

Для локусу *Xgwm508*, частота рекомбінації буде становити:

$$P = \frac{4}{[2 * (50 + 18)]} * 100\% = 2,94\%,$$

тоді, похибка частоти рекомбінації для локусу *Xgwm508* буде становити:

$$Sp = (1 + 2 * 0,0294) * \sqrt{\frac{0,0294}{2 * 99}} * 100\% = 1,28\%.$$

Для локусу *Xgwm193*, частота рекомбінації буде становити:

$$P = \frac{5}{[2 * (45 + 18)]} * 100\% = 3,96\%,$$

тоді похибка частоти рекомбінації для локусу *Xgwm193* буде становити:

$$Sp = (1 + 2 * 0,0396) * \sqrt{\frac{0,0396}{2 * 99}} * 100\% = 1,51\%.$$

Для локусу *Xgwm626*, частота рекомбінації буде становити:

$$P = \frac{4}{[2 * (49 + 18)]} * 100\% = 2,98\%,$$

тоді похибка частоти рекомбінації для локусу *Xgwm626* буде становити:

$$Sp = (1 + 2 * 0,0298) * \sqrt{\frac{0,0298}{2 * 99}} * 100\% = 1,29\%.$$

Для локусу *Xgwm219*, частота рекомбінації буде становити:

$$P = \frac{8}{[2 * (41 + 18)]} * 100\% = 6,77\%,$$

тоді, похибка частоти рекомбінації для локусу *Xgwm219* буде становити:

$$Sp = (1 + 2 * 0,0677) * \sqrt{\frac{0,0677}{2 * 99}} * 100\% = 2,08\%.$$

В результаті обрахунків ми отримали часту рекомбінації, для локусів *Xgwm508* = 2,94 ± 1,28 %, *Xgwm193* = 3,96 ± 1,51%, *Xgwm626* = 2,98 ± 1,29%, *Xgwm219* = 6,77 ± 2,08%.

Так, як рекомбінація – це перерозподілення генетичної матеріалу, що призводить до виникнення нових комбінацій генів, отримані нами дані свідчать про те, що генетичний обмін матеріалом на 6В хромосомі проходить.

Біологічний вклад процесу рекомбінації є надзвичайно важливим, так як він вносить свій вклад в процес генетичної мінливості, дозволяючи організмам пристосовуватися до середовища існування, а також забезпечує онтогенетичні перебудови генетичного матеріалу, що бере участь у регуляції роботи генів.

В нашому дослідженні, процес рекомбінації дає можливість в подальшому отримати зразки, що матимуть ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, а всю іншу частину 6В хромосоми від сорту Куяльник (*T. aestivum*). Хоч даний процес є досить складним і тривалим у часі, виведення нових високопродуктивних ліній пшениці, що матимуть підвищений вміст білка, цинку, заліза та мангану є важливим етапом для вирішення глобальної проблеми людства «прихованого голоду».

Висновки до розділу 3

1. Розроблено кодомінантну та домінантну системи молекулярних маркерів для визначення гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Розробленими молекулярно-генетичними системами проведено аналіз поколінь дослідних зразків м'якої пшениці з F₂ по F₅ покоління, що дало нам можливість відібрати зразки, що є носіями гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.
2. Розроблено кодомінантні системи мікросателітних маркерів до локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*. Розробленими молекулярно-генетичними системами було проведено аналіз зразків м'якої пшениці F₃ покоління, що дав нам можливість відібрати зразки популяції, що найбільше генетично споріднені до сорту Куяльник.
3. Обраховано частоту рекомбінації для SSR локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*, що дасть нам можливість оцінити ймовірність отримання найціннішої лінії з геном *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.
4. Публікації за результатами роботи розділу [165].

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ АЛЕЛЬНОГО СТАНУ ПУРОІНДОЛІНОВИХ ТА ГЛЮТЕНІНОВИХ ГЕНІВ У РОСЛИН НОСІЇВ *GPC-B1* ВІД *TRITICUM TURGIDUM* SSP. *DICOCCOIDES*

4.1 Контроль наявності алелей генів *GLU-1* та продуктивності рослин покоління F₅

Головним напрямком у селекції зернових культур є поліпшення якості зерна, яка характеризується вмістом білків, сирової клейковини, крохмалю, цукрів, мікроелементів, незамінних амінокислот, вітамінів, мінеральних сполук і тісно пов'язана з такими ознаками, як продуктивність, тривалість вегетаційного періоду, стійкість до хвороб і шкідників [166].

Важливу роль у визначенні високої хлібопекарської якості борошна пшениці відіграють клейковинні білки глютеніни і гліадини, які загалом складають близько 80-85% від загального вмісту білка в зерні [167]. З них найбільш цінними є глютеніни, які здатні до полімеризації шляхом утворення інтермолекулярних -S-S- зв'язків. Ці білки, головним чином, формують макромолекулярний каркас клейковини і відповідають за такі важливі властивості тіста, як його еластичність та пружність [168].

Субодиниці високомолекулярних глютенінів здебільшого мають молекулярну масу 65—90 кДа і кодуються тісно зчепленими *x* та *y* типами генів у локусах *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*, що розміщені на довгих плечах хромосом 1A, 1B, 1D [169].

Найсильніший вплив на якість борошна пшениці мають алелі локусу *Glu-D1*, за ним йдуть локуси *Glu-B1* та *Glu-A1* [170]. За шкалою якості борошна пшениці по д-р П. Пейн, найбільший індекс якості, за *Glu-D1* має алельний варіант (5+10), за *Glu-B1* (7+8; 17+18; 13+16), за *Glu-A1* (2*; 1) [171]. Перспективним для вивчення впливу високомолекулярних глютенінів на хлібопекарську якість є алель *Glu-B1al*, продуктом експресії якого є дві

субодиниці Vx7OE та Vy8*. Алель, що кодує першу з них, має підвищений рівень експресії порівняно з алелем субодиниці Vx7 [172].

Визначення алельного стану генів *Glu-1*, проводили в зразках покоління F₅, які є носіями гена *Gpc-B1* від дикої полби *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Сорт Куяльник, як материнська форма, має екстрасильні показники борошна і несе найсильніші алелі *Glu-D1d* (білкові субодиниці 5 та 10), *Glu-B1a1* (білкові субодиниці 7 (екстраекспресія) та 8), *Glu-A1b* (білкова субодиниця 2*), тоді як батьківська лінія, яка не має таких сильних хлібопекарських якостей і несе алелі *Glu-D1d*, *Glu-B1d*, *Glu-A1a*.

Для створення пшениці з високою продуктивністю важливою є оцінка таких показників як кущистість, довжина колоса, кількість зерен у колосі, маса 1000 зерен, маса зерна з одного колосу і маса зерна з усієї рослини [173].

Маса зерна з колосу є однією з важливих елементів продуктивності. Дана ознака тісно пов'язана з показниками кількості зерен у колосі, довжиною колосу та умовами вирощування [174]. Маса 1000 зерен відображає крупність і виповненість повітряно-сухих зерен. Вона також є показником якості насіннєвого матеріалу, який враховується при визначенні норми висіву, та в значній мірі визначає схожість і життєздатність [175]. Пшениця з масою 1000 зерен до 25 г має мілкі зерна, якщо від 25 г до 35 г – зерна середнього розміру, якщо більше 35 г – крупного розміру.

Одним з етапів роботи був аналіз ліній пшениці F₅ покоління. Наше завдання: перевірити на наявність та гомозиготність гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*. Наступним етапом роботи була перевірка ліній на встановлення алельного стану генів *Glu-1*.

Найціннішим алелем для якості борошна вважається *Glu-D1d*. Для виявлення алельного стану гена *Glu-D1*, була використана мультиплексна ПЛР з специфічними праймерами до локусу [152]. Розділення продуктів ампліфікації проводили у 2,5%-му агарозному гелі в ультрафіолетовому світлі із залученням етидйброміду як фарбувального реагенту.

Типова електрофореграма результатів мультиплексної ПЛР представлена на рис. 4.1.

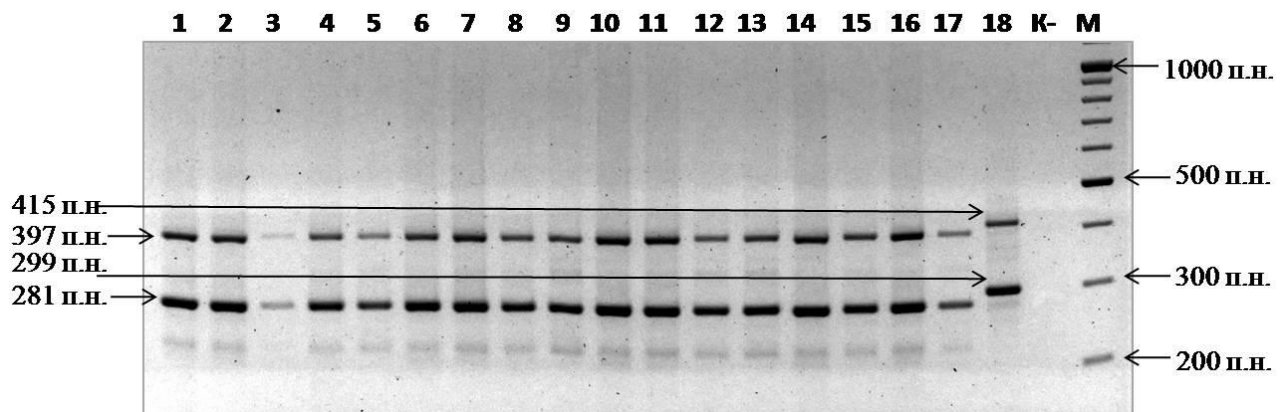


Рис. 4.1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ділянок гена *Glu-D1*. Доріжки 1-15 – зразки популяції пшениці F_5 покоління; 16 – сорт Куяльник, носій *Glu-D1d*; 17 – лінія Glupro, донор гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*; 18 – сорт Золотоколоса, контроль на алель *Glu-D1a*; К- – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Обраною системою молекулярно-генетичних маркерів було проаналізовано 44 лінії пшениці. Довжина очікуваних ампліконів становила: *Glu-D1*(5) – 281 п.н., *Glu-D1*(2) – 299 п.н., *Glu-D1*(10) – 397 п.н., *Glu-D1*(12) – 415 п.н. Сорт Куяльник і лінія Glupro мають алель *Glu-D1d*, тобто (5+10), поліморфізму у дослідних ліній не виявлено. Всі вони мали алельний стан гена *Glu-D1d*. В якості контролю на алель *Glu-D1a*, було використано сорт пшениці української селекції Золотоколоса (доріжка №18). Наявність алельного стану гена *Glu-D1d* у всіх лініях є позитивним, так як саме даний алель має найсильніший вплив на якість борошна.

Наступним етапом роботи був аналіз ділянки гена *Glu-A1*. Материнський сорт пшениці Куяльник є носієм алеля *Glu-A1b*, який кодує субодиницю 2*, тоді як батьківська донорна лінія Glupro несе алель *Glu-A1a*

(субодиниця 1), що показано в попередніх дослідженнях білкових фракцій у поліакриламідному гелі [176].

Аналіз проводили за допомогою мультиплексною ПЛР з кодомінантною парою праймерів [152] та референтним геном пшениці *actin*. Розділення продуктів ампліфікації проводили в 2 %-му агарозному гелі, ідентифікували за допомогою ультрафіолетового світла із залученням етидійброміду як фарбувального реагенту. Типова електрофореграма результатів мультиплетної ПЛР представлена на рис. 4.2.

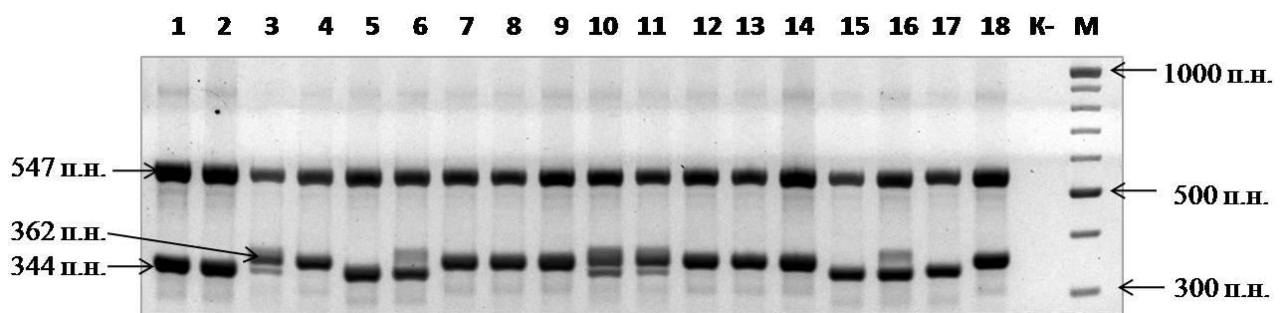


Рис. 4.2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ділянок генів *Glu-A1* та *actin*. Доріжки 1-16 – зразки популяції пшениці F₅ покоління; 17 – сорт Куяльник, носій *Glu-A1b*; 18 – лінія Glupro, донор гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*; К- – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Довжина очікуваних ампліконів: у разі наявності субодиниці *Glu-A1b* – 344 п.н.; у разі наявності субодиниці *Glu-A1a* – 362 п.н. Наявність референтного амплікону *actin* на довжині 547 п.н. свідчить про адекватний перебіг реакції та про відсутність хибнонегативних результатів. Серед перевірених 44 зразків було виявлено, що 11-ть з них несуть *Glu-A1b*, 22-і – *Glu-A1a*, а 11-ть – гетерозиготні. Субодиниці 1 та 2* однаково добре впливають на якість борошна, тому для нас представляють цінність стабільні гомозиготні лінії з будь яким з цих алелів.

Зразки популяції – носії гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* аналізували на наявність субодиниці *Glu-B1a1*, яка присутня лише у материнському сорті Куяльник, тоді як батьківська лінія несе *Glu-B1d*, який кодує синтез субодиниць 6 та 8. Аналіз зразків проводили мультиплексною ПЛР з референтним геном *TaTM20*. Розділення продуктів ампліфікації проводили у 2 %-му агарозному гелі в ультрафіолетовому світлі із залученням етидій броміду, як фарбувального реагенту. Типова електрофореграма продуктів мультиплексної ПЛР наведена на рис.4.3.

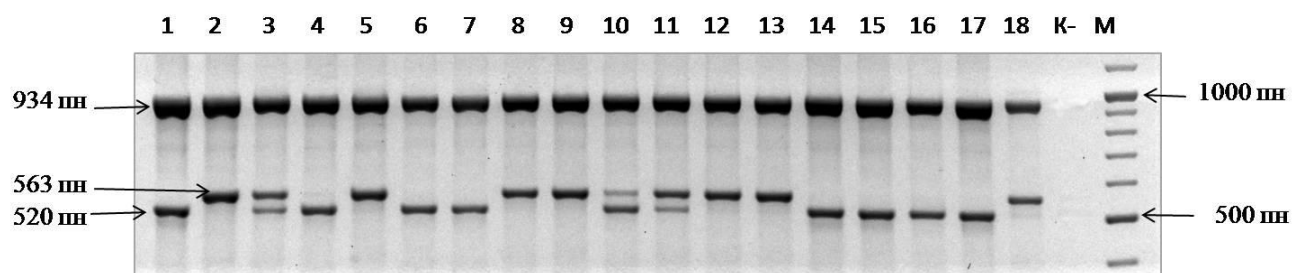


Рис.4. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації регіону MAR гена *Glu-B1a1* та референту *TaTM20*. Доріжки 1-16 – зразки популяції пшениці F₅ покоління; 17 – лінія Glupro, донор гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*; 18 – сорт Куяльник, містить *Glu-B1a1*; K- – негативний контроль, без ДНК; M – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Довжина очікуваних ампліконів: для референтного гена *TaTM20* – 934 п.н., за наявності *Glu-B1a1* – 563 п.н., відсутності – 520 п.н. Серед перевірених 44 ліній було виявлено 21-у гібридну лінію, що несе *Glu-B1a1*, 16-ть ліній, що несуть *Glu-B1d* і 7-м ліній гетерозиготних. Інтерес представляють лінії, що несуть алель *Glu-B1a1*, тому що наявність *Glu-B1d* значно знижує якість борошна. Алель *Glu-B1d* передається від батьківської лінії Glupro донора гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Даний алель погіршує якість борошна.

Для оцінки продуктивності зразків, було проведено аналіз маси 1000 зерен, кількість зерен в одному колосі, а також маса зерен в одному колосі. Для розрахунку маси 1000 зерен пшениці відраховували дві проби по 500 зерен кожна. Обчислювали середньоарифметичне значення мас обох повторів, їхню суму, а також фактичну розбіжність між ними. Остання не повинна перевищувати 3% від середньоарифметичного за ДСТУ 4138-2002. Розрахунок ваги і кількості зерен в одному колосі проводили в трьох повторностях, середньоарифметичне значення наведено в табл.4.1.

Результати аналізу ліній пшениці F₅ покоління представлені в табл.4.1.

Таблиця 4.1. Зведені результати визначення показників продуктивності та алельного стану локусу *Glu-1*

№ лінії	Маса 1000 зерен, г	Кількість зерен в 1 колосі, шт	Вага зерен з 1 колосу, г	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>
1	37,58	36	1,692	b	d	d
2	36,51	40	1,554	b	al	d
5	34,23	48	1,757	b/a	al/d	d
7	32,23	42	1,676	a	d	d
8	30,96	38	1,413	b	al	d
9	33,45	59	1,765	b/a	d	d
10	28,35	55	1,648	a	d	d
11	31,73	45	1,696	a	al	d
12	37,00	53	2,125	a	al	d
14	30,95	49	1,507	b/a	al/d	d
15	30,39	51	1,703	b/a	al/d	d
17	27,53	62	1,683	a	al	d
18	36,13	45	1,718	a	al	d
19	32,87	42	1,488	a	d	d
20	29,83	50	1,465	b	d	d
21	23,40	54	1,448	b/a	d	d
30	31,39	55	1,702	a	d	d
35	36,53	55	2,168	a	al	d
36	41,01	55	2,226	b	al	d
38	36,47	37	1,316	a	al	d
39	38,10	39	1,503	a	al	d
40	40,93	56	2,261	a	al	d
41	36,89	38	1,378	a	al	d

№ лінії	Маса 1000 зерен, г	Кількість зерен в 1 колосі, шт	Вага зерен з 1 колосу, г	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>
42	36,65	57	2,211	b/a	al/d	d
44	39,16	54	2,126	b/a	al	d
45	40,57	53	2,154	b/a	al/d	d
46	59,38	47	2,194	b/a	al	d
49	43,08	51	2,323	b/a	al	d
50	45,35	48	2,048	a	al/d	d
51	35,51	54	1,999	a	d	d
56	37,97	53	2,029	a	d	d
58	36,36	44	1,861	b	al	d
60	38,60	49	1,903	b	d	d
62	32,23	53	1,653	a	al/d	d
64	38,22	49	1,832	a	al	d
66	34,37	44	1,364	a	d	d
67	38,70	55	2,130	b	d	d
68	37,50	52	1,996	a	al	d
75	36,57	51	1,894	b/a	al	d
76	27,10	52	1,451	b/a	al	d
80	37,86	35	1,512	b	d	d
81	57,04	51	2,238	b	d	d
84	40,32	49	2,016	b	d	d
86	34,51	43	1,464	a	al	d
Куял.	39,50	53	2,115	b	al	d
Glupro	28,15	49	1,503	a	d	d

Примітки: Куял. – сорт Куяльник, материнська форма; Glupro – батьківська лінія-донор гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Лінії F₅ покоління вирощувалися рядками по 1,5 м, тому продуктивність оцінювали через такі параметри, як маса 1000 зерен, кількість зерен в 1 колосі і вага зерен з 1 колосу. Збільшення врожайності пшениці озимої супроводжувалась зміною окремих елементів структури врожайності. Вирішальними чинниками у збільшенні врожайності є продуктивне кущення, кількість зерен у колосі і маса зерна з одного колоса [152].

Маса зерна з одного колоса також є одним із важливих елементів продуктивності. За літературними даними продуктивність - ознака, що тісно

пов'язана з такими показниками, як кількість зерен у колосі, довжина колосу та умови вирощування. Маса 1000 зерен залежить від умов, зони вирощування, а також сорту.

Отримані дані, за масою 1000 зерен ліній, дають можливість оцінити їх за якістю виповнення зерна. Материнська лінія сорту Куяльник, має масу 1000 зерен 39,5 г, тоді як у батьківській формі лінії Glupro, маса 1000 зерен – 28,15г. Серед проаналізованих 44 ліній, 8 мали масу 1000 зерен вище ніж в материнському сорті Куяльник, тому саме на ці лінії варто звернути особливу увагу. Також було помічено пряму залежність між масою 1000 зерен та масою зерен з одного колосу; залежності між масою 1000 зерен і кількістю зерен з одному колосі не помічено. Для швидкої оцінки продуктивності, можна використовувати, такий показник, як маса зерен з одного колосу, який набагато швидше і простіше порахувати в порівнянні з масою 1000 зерен.

Аналіз алельних варіантів локусів *Glu-A1* серед ліній пшениці F₅ покоління показав, що більшість ліній, а саме 22 несуть алель *Glu-A1a*, що передавався від ліній Glupro. Алелі *Glu-A1a*, *Glu-A1b* помітно добре впливають на властивості білка пшениці. Вміст клейковини та поглинання води борошном збільшуються у генотипів з алелем *b*, при цьому зменшується час формування тіста [177, 178]. Серед досліджуваних ліній, було виявлено 11-ть ліній, що несли алель *b*, від материнського сорту Куяльник.

Досліджуючи алельні варіанти локусів *Glu-B1*, було виявлено 21-ну лінію, що несла алель *Glu-B1a1*. Продуктом експресії алеля *Glu-B1a1* є дві субодиниці Vx7^{OE} та Vy8*. Перша з них (Vx7^{OE}) має підвищений рівень експресії порівняно з субодиницею зі звичайним рівнем (Vx7) [172]. Алель *Glu-B1a1* має значний позитивний вплив на якість борошна за рахунок підвищення пружності та сили борошна [179]. Алель *Glu-B1d* гірше впливає на якість борошна ніж алель *Glu-B1a1* [171].

Алель локусу *Glu-D1d*, був виявлений у всіх досліджуваних лініях. Даний алель має найбільшу цінність серед всіх алелей *Glu-D1*, тому отримані результати полегшують відбір найкращих ліній, за комбінацією алелей *Glu-1*.

За трьома локусами *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* виявлено 16-ть найбільш цінних зразків популяції – №2, №8, №11, №12, №17, №18, №35, №36, №38, №39, №40, №41, №58, №64, №68, №86. Вони містять оптимальну для хлібопекарської якості алельну формулу локусу *Glu-1* (*Glu-A1a* або *Glu-A1b*, *Glu-B1a1*, *Glu-D1d*). За результатами аналізу маси 1000 зерен виявлено, що дві (№36, 40) з 16 ліній мають значення маси більше за материнський сорт. Показано, що комбінування в нащадках алелей, відповідальних за підвищення якості борошна, є важливим етапом створення екстрасильних сортів пшениці. Максимальний ефект алеля досягається правильним підбором генетичного оточення.

Чітка ідентифікація алелів локусів *Glu-1* робить можливим чіткий, направлений відбір зразків популяції, не лише за показниками вмісту білка чи мікроелементів, а й за генетичною складовою. Це дасть можливість відбору найкращих ліній, для подальшої селекції.

4.2 Аналіз алельного складу генів *Pina-D1*, *Pinb-D1* у популяції рослин пшениці покоління F₅

Текстура ендосперму є критичною характеристикою якості пшениці *Triticum aestivum* L. За ознакою «hardness» сорти м'якої пшениці можна поділити на твердозерні («hard») та м'якозерні («soft») [107]. На сьогодні використовують два методи фізичного визначення твердості зерна: встановлення індексу розміру часточок (particle size index, PSI) за виходом борошна, просіяного крізь сито з отворами певного розміру, та використання інфрачервоної спектроскопії в ближньому діапазоні випромінювання (NIR) [177].

Твердозерна пшениця є цінною для хлібопекарської промисловості тому, що під час помолу утворюється велика кількість пошкоджених гранул крохмалю, що призводить до більшого поглинання та утримання води, забезпечуючи ефективніший підйом тіста. Ендосперм м'якозерної пшениці являється більш крихким і потребує менших зусиль при розмелюванні. Борошно з м'якозерної пшениці формується з меншими розмірами часток і з великим вмістом непошкоджених крохмальних гранул. Воно слабкіше поглинає воду і тому, технологічно більш підходить для випікання печива та бісквітів [180].

Твердозерність ядра зерна виступає результатом взаємодії ліпідно-зв'язуючих білків пуроіндолінів, багатих на цистеїн і триптофан, які взаємодіють з ліпідами на поверхні гранул крохмалю. Текстура ендосперму контролюється кількома зчепленими генами, розміщеними на короткому плечі хромосоми 5D у локусі *Ha* (*Hardness*). Гени кодують три поліпептиди, які складають білок фріабілін: пуроіндолін *a* (ген *Pina-D1*), пуроіндолін *b* (ген *Pinb-D1*) та Grain Softness Protein (ген *Gsp-1*) [180, 181, 182]. Градація технологічно важливої ознаки твердозерності м'якої пшениці значною мірою обумовлена комбінаціями алелів пуроіндолінових генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*.

Текстура ендосперму – один з важливих факторів при селекції цінних форм рослин, що визначає галузь харчової промисловості, де будуть в подальшому використовуватися сорти пшениці. Оцінку текстури ендосперму проводили за допомогою ПЛР-маркерних систем за результатами алельного стану генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*.

Аналіз ліній пшениці за геном *Pina-D1* проводили за допомогою молекулярних маркерів наведених в статті [153]. Розділення продуктів ампліфікації проводили у 1,5%-му агарозному гелі в ультрафіолетовому світлі із залученням 0,5 мкг/мл бромистого етидію, як фарбувального реагенту. Типова електрофореграма продуктів мультиплетної ПЛР ампліфікації гена *Pina-D1* представлена на рис. 4.4.

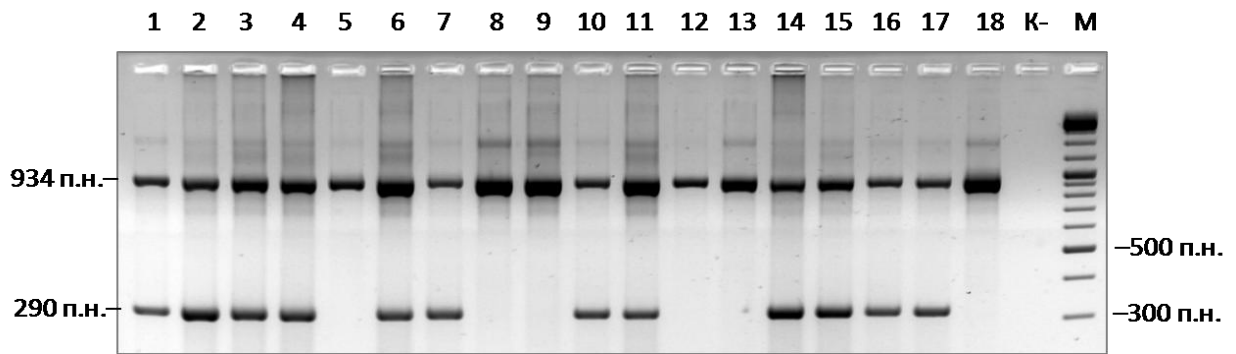


Рис. 4.4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ділянки гена *Pina-D1*.

Доріжки 1-16 – зразки популяції пшениці F₅ покоління; 17 – сорт Куяльник; 18 – лінія Glupro, донор гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*; К – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Поява амплікону розміром 290 п.н., свідчить про наявність алелю *Pina-D1a*, успадкованого від материнського сорту Куяльник, тоді як відсутність даного амплікону вказує на наявність алелю *Pina-D1b*, як у батьківської лінії Glupro. В якості референтного гена був використаний ген TaTM20 з розміром амплікону 934 п.н. наявність фрагменту на цій довжині вказує на адекватний перебіг реакції і якісно виділену ДНК. Аналіз зернівок показав, що серед 44 ліній 32 мали алель *Pina-D1a*, а 12 – *Pina-D1b*. Переважна більшість сортів української селекції несуть алель *Pina-D1a* [111], тому привнесення нового генетичного матеріалу алеля *Pina-D1b*, має позитивний вплив на подальшу селекцію українських сортів.

Розділення продуктів ампліфікації, після гідролізу рестриктазою MbiI, на ген *Pinb-D1* проводили у 2%-му агарозному гелі в ультрафіолетовому світлі із залученням 0,5 мкг/мл бромистого етидію, як фарбувального реагенту. Типова електрофореграма продуктів гідролізу ПЛР на ген *Pinb-D1* представлена на рис. 4.5.

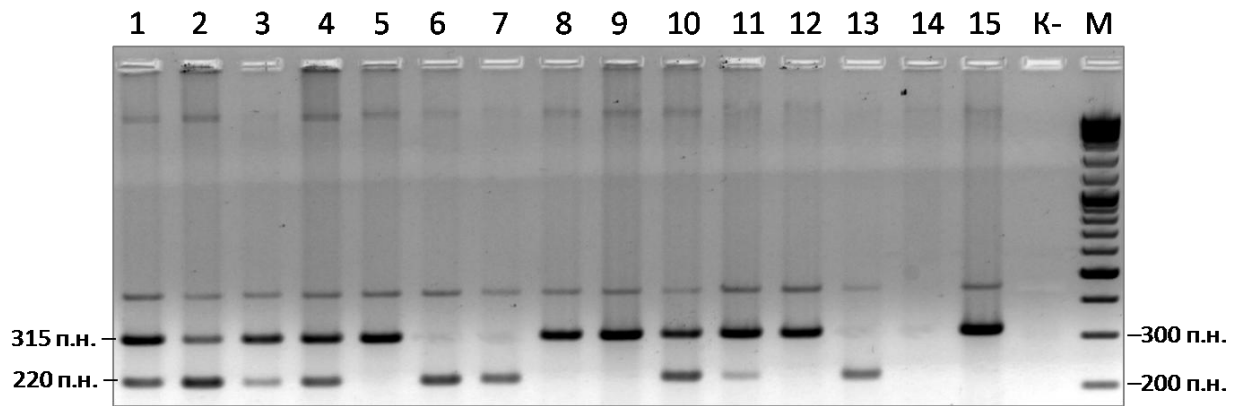


Рис. 4.5. Електрофореграма продуктів гідролізу ПЛР на ген *Pinb-D1*. Доріжки 1-12 – зразки популяції пшениці F₅ покоління; 13 – сорт Куяльник; 14 – сорт Langdon; 15 – лінія Glupro, донор гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*; K- – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Амплікони на довжині 315 п.н., вказує на наявність алеля *Pinb-D1a*, тоді як амплікон розміром 220 п.н. – на алель *Pinb-D1b*. З проаналізованих 44 ліній, 12 мають алель *Pinb-D1a*, 17 – *Pinb-D1b*, а 15 були гетерозиготними за даним геном.

Більшість ліній містять алелі *Pina-D1a* та *Pinb-D1b*, що характерно для сортів української селекції і материнського сорту Куяльник. Наявність алелів *Pina-D1b* та *Pinb-D1a* характерна для сортів пшениці США [183], звідки і походить донорна лінія Glupro – носій гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, яка в нашому експерименті є вихідною батьківською лінією [147].

Фізичний показник твердозерності було перевірено в 16 дослідних лініях, також у батьківської лінії Glupro та материнського сорту Куяльник. Визначення було проведено лише для 16 дослідних ліній із 44, тому, що обмежуючим фактором була маса зерна. Для аналізу було необхідно 50 г зерна, яке перемелювалося на муку, нажаль не для всіх ліній ми могли

виділити таку масу зерна для аналізу. Дані аналізу наведені у підсумковій табл. 4.2.

Таблиця 4.2. Алелі генів *Pina*, *Pinb* і значення показника твердозерності у дослідних лініях пшениці F₅ покоління

№ лінії	Алелі		Твердозерність
	<i>Pina</i>	<i>Pinb</i>	
1	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/Pinb-D1b</i>	-
2	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/ Pinb-D1b</i>	11
5	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/ Pinb-D1b</i>	-
7	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/ Pinb-D1b</i>	10
8	<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	-
9	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	17
10	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	-
11	<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	-
12	<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	-
14	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/Pinb-D1b</i>	-
15	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/Pinb-D1b</i>	-
17	<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	-
18	<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	-
19	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	7
20	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/ Pinb-D1b</i>	-
21	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/ Pinb-D1b</i>	-2
30	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/ Pinb-D1b</i>	-
35	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	-
36	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	-
38	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	11
39	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	28
40	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/ Pinb-D1b</i>	20
41	<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	43
42	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/ Pinb-D1b</i>	14
44	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	9
45	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	-
46	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/ Pinb-D1b</i>	-
49	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	-
50	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/ Pinb-D1b</i>	-
51	<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	
56	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	-
58	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/ Pinb-D1b</i>	-
60	<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	-
62	<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	-

64	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	26
66	<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	31
67	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	-
68	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/ Pinb-D1b</i>	-
75	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	7
76	<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	-
80	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	30
81	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	-
84	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	-
86	<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	34
Сорт Куяльник	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	16
Лінія Glupro	<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	15

Прим. «-» – зразки не аналізувалися за даним показником.

Метод інфрачервоної спектрометрії показав, що всі лінії і батьківські форми, мають не більше 45 одиниць твердозерності, що відповідає групі м'язозерних сортів пшениці. В дослідженні були присутні всі варіації алелів пуринодолинових генів. За даними дослідників, сорти, що несуть алелі *Pina-D1b*, *Pinb-D1a*, повинні мати більшу твердість ядра в порівнянні з сортами, що несуть алелі *Pina-D1a*, *Pinb-D1b* [183].

Статистична обробка даних вказує, що значення твердозерності для ліній, які мали алель *Pina-D1b* гена *Pina-D1*, була вищою ніж для ліній, які мали алель *Pina-D1a* ($p < 0,05$). В той же час різниця між медіанами за цим параметром для різних комбінацій алелів гена *Pinb-D1* знаходилася в межах статистичної похибки. Крім того лінії, в яких було виявлено комбінацію алелів *Pina-D1b Pinb-D1a* (медіана = 37) мали статистично достовірну вищу твердозерність ($p < 0,05$) ніж лінії, в яких було виявлено комбінацію алелів *Pina-D1a Pinb-D1b* (медіана = 14), що добре узгоджується з літературними даними, отриманими на північно американських пшеницях [183].

Аналіз алельного стану пуринодолинових генів виявив їх широке різноманіття серед зразків популяції. За допомогою статистичної обробки даних з'ясовано, що комбінація алелів *Pina-D1b Pinb-D1a* є більш бажаною

для підвищення твердості зерна, перевищуючи за своїм значенням навіть показники такого високоякісного стандарту, як сорт Куяльник.

Серед більшості сортів української селекції, комбінації алелей пуроіндолінових генів *Pina-D1b Pinb-D1a* не виявлено. Тому лінії пшениці – носії гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, що є носіями алелей *Pina-D1b Pinb-D1a*, є дуже цінними для української селекції, так як можуть урізноманітнити генетичний матеріал і зробити більш направлене використання сортів пшениці у харчовій промисловості. Направлений підхід до використання м'якозерних і твердозерних сортів пшениці, як наслідок підвищить якість харчових продуктів, що виробляються з пшеничного борошна.

Висновки до розділу 4

1. Проведено молекулярно-генетичний аналіз алелів генів глютенінів, що впливають на такі важливі характеристики тіста, як еластичність та пружність. За результатами проведеного аналізу ліній м'якої пшениці F₅ покоління, носії гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, було відібрано 16-ть найбільш цінних ліній, що містять оптимальну для хлібопекарської якості алельну формулу локусу *Glu-1* (*Glu-A1a* або *Glu-A1b*, *Glu-B1a1*, *Glu-D1d*).
2. Проведено молекулярно-генетичний аналіз алельного стану пуроіндолінових генів та визначено фізичний показник твердозерності зразків популяції F₅ покоління носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. В результаті проведеного аналізу в лініях м'якої озимої пшениці, було виявлено, що з 44 ліній, 17 мали алельний стан гена, як у батьківського сорту Куяльник, який має надзвичайно високі показники хлібопекарської якості, а також було виявлено 12 унікальних ліній, що мали алельний стан генів *Pina-D1b*, *Pinb-D1a*, що не притаманний для сортів української селекції.
3. Публікації за результатами роботи розділу [184, 185].

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ ГЕНА *GPC-B1* ВІД *TRITICUM TURGIDUM* SSP. *DICOCCOIDES* НА ВМІСТ БІЛКА ТА МІНЕРАЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ У ЗЕРНІВКАХ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

5.1 Визначення вмісту білка в лініях-носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*

Пшениця забезпечує приблизно одну п'яту від загального калорійного вкладу населення всього світу. На даний момент, близько 95% пшениці, що вирощується в світі, це гексаплоїдна м'яка пшениця (*Triticum aestivum*), інші 5% складає тетраплоїдна тверда пшениця (*Triticum durum*) [5].

Висока цінність та незамінність пшеничного борошна зумовлена особливістю структурного складу зернівки, що складається на 13-17% висівки, 2-3% зародку і 81-84% ендосперму. Незвичайні властивості пшениці пов'язані з білковим комплексом, що складається з гліадинів, глютенінів, альбумінів і глобулінів [186]. Більша частина пшеничного зерна – запасаючі білки гліадини і глютеніни, які складають 80-85% від загального вмісту білка в зерні. Альбуміни і глобуліни – структурні і ферментні білки алеїронного шару і зародку [117]. Запасаючі білки несуть основне функціональне навантаження, щодо їх впливу на якість клейковини. Глютеніни здатні до полімеризації шляхом утворення інtermолекулярних -S-S-зв'язків, що формують макромолекулярний каркас клейковини і відповідають за еластичність та пружність тіста [118]. Гліадини складають близько 40-50% від загального білка і сприяють еластичності і міцності клейковини.[186].

Масова частка білка у перерахунку на суху масу є однією з характеристик оцінки якості зерна, яке нормується ДСТУ 3768:2010. Відповідно до державного стандарту пшениця 1-го класу повинна містити масову частку білка в зерні не менше 14%, 2-го класу – не менше 12,5%, 3-го не менше 11%. Проте в останні десятиріччя, на противагу зростанню

врожайності, якісні показники зерна погіршуються, включаючи показник вмісту загального білка.

Складність у процесі підвищення вмісту загально білка полягає в тому, що у процесі підвищення виникає високий екзогенний ефект і протидія комплексу генетичних систем, що регулюють дану характеристику. Особливий інтерес в цьому напрямку, представляє ген *Gpc-B1*, що розташований на короткому плечі хромосомі 6В, який сприяє підвищеному накопиченню білка (в середньому 14 г на кг⁻¹) у гексаплоїдній та тетраплоїдній пшениці в різних кліматичних умовах [125].

Визначення вмісту загального білка в лініях пшениці F₅ покоління проводили паралельно двома сучасними методами: методом інфрачервоної спектроскопії (NIR) та методом К'ельдаля.

Для аналізу було відібрано 44 лінії, що попередньо були перевірені на наявність гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* і мали гомозиготний стан гена.

Серед проаналізованих 44 ліній методом К'ельдаля: 12 мали загальний вміст білка вище 14%; 30 ліній – вище 12,5%; і 2 лінії – вище 12%. Максимально високий вміст білка виявлено у лінії №10 – 16,18%, а мінімальний – у лінії №17 – 12,14%. В середньому спостерігався приріст на 14,40%, відносно материнського сорту Куяльник. При цьому вміст білка у материнського сорту Куяльник становив 11,85%, а у батьківської лінії Glupro – 15,84%. Хоча лінія Glupro і характеризується високим вмістом білка, проте на противагу сорту Куяльник не вирізняється за екстер'єром, є маловрожайною і низькорослою, тобто не є перспективною для промислового вирощування. Підсумковий графік визначення білка методом К'ельдаля в дослідних лініях – носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* і порівняння з батьківськими культурами наведено на рис. 5.1.

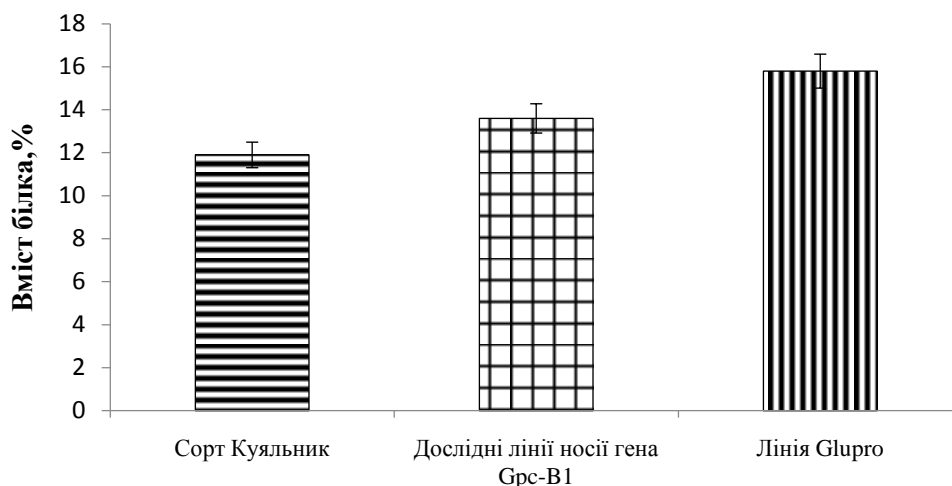


Рис. 5.1. Графік результатів визначення вмісту білка методом К'ельдаля.

Згідно ДСТУ 4117:2007 існує сучасна експрес методика вимірювання якісних показників зерна, одним із яких являється визначення масової частки білка, основана на інфрачервоній спектроскопії (NIR). Дана методика є менш точною у порівнянні з методом К'ельдаля, але має ряд переваг, таких як швидкість проведення, простота, відсутність реактивів і малі витрати трудових ресурсів. Для проведення аналізу необхідно 50 г зерна. Не всіх ліній у нас була в наявності необхідна маса зерна, тому аналіз був проведений на 16 дослідних лініях.

Серед проаналізованих 16 ліній, масова частка білка склала від 14,23% до 16,81%, тоді як у сорту Куяльник ми спостерігали вміст білка 13,49%. У лінії Glupro масова частка білка становила 16,9%. Найбільший вміст білка серед дослідних сімей спостерігався у сім'ї №7 і склав 16,81%. Найменший вміст білка спостерігався у сім'ї №21 і склав 14,23%, що в будь-якому випадку достовірно більше ніж у вихідного материнського сорту Куяльник. В середньому серед ліній спостерігається приріст білка на 13,93% в порівнянні з вихідним сортом Куяльник. Графік порівняння вмісту білка у дослідних лініях і вихідних культурах наведено на рис. 5.2.

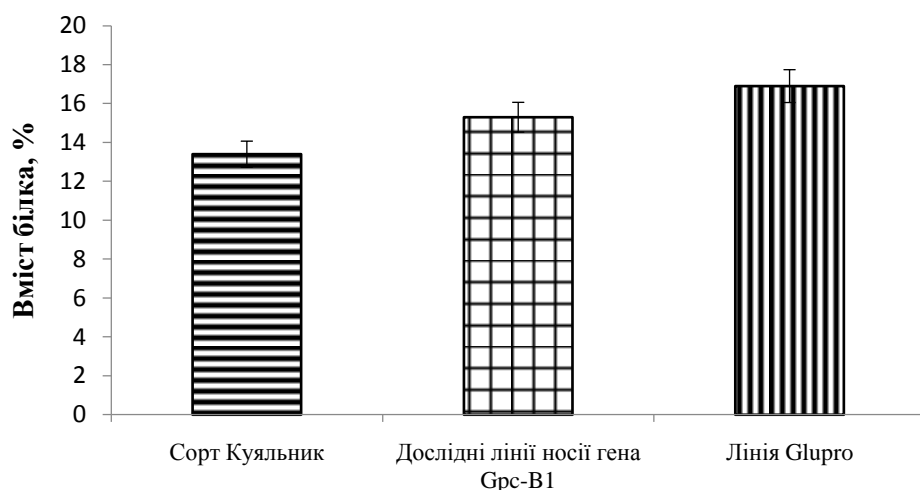


Рис. 5.2. Графік результатів визначення вмісту білка методом NIR.

Отримані дані аналізу за двома методами перевірки вмісту білка співпадають і чітко вказують на те, що лінії - носії гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoide* мають підвищений вміст загального білка у зерні в середньому на 14% в порівнянні з вихідним материнським сортом Куяльник. Підсумкова таблиця результатів за двома методами аналізу наведена табл. 5.1.

Табл. 5.1. Підсумкова таблиця результатів, за методами К'ельдаля і NIR по визначенню вмісту загального білка.

Номер сім'ї	Визначення білка методом К'ельдаля, %	Визначення білка методом NIR, %
1	13,97	-
2	13,68	15,89
5	12,83	-
7	13,40	16,81
8	12,31	-
9	13,85	15,64
10	16,18	-
11	14,76	-
12	15,11	-
14	13,45	-
15	12,94	-
17	12,14	-

Номер сім'ї	Визначення білка методом К'ельдаля, %	Визначення білка методом NIR, %
18	12,94	-
19	13,85	14,70
20	13,00	-
21	12,88	14,23
30	13,45	-
35	15,05	-
36	14,82	-
38	12,54	14,56
39	13,68	15,24
40	14,48	15,36
41	13,00	15,14
42	14,25	15,49
44	14,93	15,93
45	14,59	-
46	13,57	-
49	13,11	-
50	13,57	-
51	13,11	-
56	12,71	-
58	14,25	-
60	14,82	-
62	13,62	-
64	13,91	15,67
66	13,51	15,66
67	13,11	-
68	12,77	-
75	13,74	15,32
76	14,31	-
80	13,05	14,86
81	13,40	-
84	13,11	-
86	12,71	15,45
Сорт Куяльник	11,85	13,49
Лінія Glupro	15,84	16,90

Прим. «-» – зразки не аналізувалися за даним показником.

Статистична обробка даних проводилася за t-критерієм Стюдента. Для дослідних вибірок цей критерій склав 6,92 з вірогідністю $p < 0,05$ при рівні значущості $\alpha = 0,05$. Число ступеней свободи для вибірок складає 62. Критичне значення t-критерію Стюдента для цього числа ступеней свободи складає 1,999. Якщо отримане значення t-критерію для дослідних вибірок більше критичного значення, що є в нашому випадку, це свідчить про те, що дані достовірні.

Комплексний аналіз ліній м'якої озимої пшениці – носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoide* методом К'ельдаля та NIR є надзвичайно важливим для подальших селекційних робіт і наступного планування. Хоча в результатах вимірів між даними з різних методик були розбіжності, статистична обробка даних за t-критерієм Стюдента підтверджує достовірність результатів. Остаточний аналіз з врахуванням даних, отриманих обома методиками свідчать, що в середньому вміст білка в лініях підвищується на 14% у порівнянні з вихідним сортом Куяльник. Особливу увагу потрібно звернути на лінії №10, №12 і №35, у яких загальний вміст білка перевищує 15% за метод К'ельдаля. Отримані результати свідчать, що перенесений ген *Gpc-B1* з дикої полби *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoide* в нове генетичне оточення високопродуктивного сорту Куяльник функціонує, позитивно впливаючи на накопичення загального білка в зернівках м'якої озимої пшениці.

5.2 Контроль вмісту мінеральних елементів в лініях-носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoide*

Збалансований вміст мікроелементів у зерні пшениці є не лише важливим для формування високих посівних якостей насіння, але й для забезпечення поживної цінності збіжжя. Чинний державний стандарт ДСТУ 3768:2010 регламентує безпечні для життя і здоров'я людини рівні деяких мікроелементів у зерні пшениці. Низький рівень вмісту Zn, Fe й Mn в

грунтах і сільськогосподарських культурах зустрічається у всіх країнах та особливо небезпечний в регіонах вирощування зернових культур, де зернові є основою харчування людини. Проблема нестачі біологічно важливих мікроелементів, таких як Fe і Zn, є актуальною для понад двох мільярдів людей в усьому світі, а найбільше від їх дефіциту страждають вагітні жінки та діти віком до 5 років [23, 116, 187].

У європейських країнах, зернові, в першу чергу пшениця, забезпечують близько 30% щоденного споживання калорій, в Центральній Азії – в середньому 50% [40, 116]. При цьому, у пшениці не завжди міститься достатня кількість мікроелементів для належного забезпечення раціону людини [189].

Вміст мікроелементів в зерні пшениці детермінується генетично та залежить від факторів навколишнього середовища. Рівень потрапляння мікроелементів у генеративні органи пшениці достатньо низький, тому є перспективним напрям генетичного поліпшення культури. Одним із напрямків генетичного поліпшення сортів щодо підвищеного вмісту мікроелементів є перенесення генів в пшеницю від диких родичів, таких, наприклад, як спельта та полба [189, 190].

Залізо, цинк та марганець є одними з важливих елементів, що забезпечують редокс-гомеостаз живих організмів.

Залізо доступне для рослин у формі Fe^{+2} та Fe^{+3} . Ці іони відіграють важливу роль у процесах обміну речовин, входять до складу ферментів, що приймають участь в синтезі хлорофілу, є компонентом циклу трикарбонових кислот. За нестачі заліза у рослин розвивається міжжилковий хлороз і, як наслідок, порушується синтез хлорофілу та активність фотосинтезу. Залізо є одним із найважливіших елементів в організмі людини та входить до складу багатьох субстратів і ферментів, що відповідають за транспорт кисню до клітин, функціонування дихального ланцюга мітохондрій, окислювально-відновних клітинних реакцій, антиоксидантний захист, функціонування нервової та імунної систем. Близько 60% заліза в організмі людини міститься

в гемоглобіні. Нестача цього мікроелементу обумовлює, в першу чергу, розвиток гіпохромної анемії. Добова доза заліза для дорослих складає 15 мг [191, 192, 193].

Цинк рослини найчастіше використовують в якості двовалентного катіона Zn^{+2} . Він є одним із найважливіших мікроелементів, необхідних у регулюванні обміну вуглеводів та ряду ферментів, задіяних у ростових процесах. Цинк є кофактором більш ніж 80 ферментів та виступає в якості структурного компонента численних білків [194]. Роль цинку в життєдіяльності людини обумовлена в основному тим, що він входить у більше ніж 40 важливих ферментів, що каталізують гідроліз пептидів, білків, деяких ефірів і альдегідів. Цинк бере участь у вуглеводневому обміні та є складовою інсуліну. Тільки за присутності цинку діє вітамін А. Цей іон необхідний для формування кісткової системи. Нестача цинку в організмі має плейотропний ефект щодо експресії мРНК сотень генів, змінюючи біосинтез багатьох цинковмісних білків і транскрипційних факторів. Добова доза цинку для дорослих складає 12 мг [187, 195, 196].

Марганець рослини поглинають у формі двовалентного катіону Mn^{+2} . Він виконує структурну роль в мембранній системі хлоропластів [197]. Дефіцит марганцю призводить до міжжилкового хлорозу молодих і старих тканин рослини [194]. Марганець входить до складу активного центру багатьох ферментів, приймає участь у згортанні крові, регулює перетворення молекулярного кисню. Також іони марганцю беруть участь в синтезі вітамінів групи В і впливає на синтез гемоглобіну. Нестача марганцю призводить до порушення вуглеводневого обміну, затримки росту волосся та нігтів, дерматиту, порушення утворення хрящів, остеопорозу. Добова доза марганцю для дорослих складає 2,0-5,0 мг [197].

Зважаючи на біологічну важливість заліза, цинку та марганцю, а також на дані, що ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* підвищує вміст цих мінеральних елементів, зразки популяції F_4 та F_5 поколінь пшениці було проаналізувати на вміст мікро- та мезоелементів.

Визначення вмісту елементів у зразках зерна проводили на мас-спектрометрі з індуктивно зв'язаною плазмою ICP-MS – це надточний сучасний метод визначення елементів в пробах. Завдяки використанню мас-детектора досягається висока селективність методики.

За результатами ICP-MS детектування вмісту ряду елементів у дозрілих зернівках пшениці F₄ покоління 8 гомозиготних зразків, де контролем слугував батьківський сорт Куяльник, нами показано наступне (табл. 5.2).

Таблиця 5.2. Вміст мікро- та мезоелементів у фізіологічно дозрілих зернівках пшениці урожаю 2015 року, (мг/кг сухої речовини)

Варіант	Мікроелементи				Мезоелементи	
	Zn	Fe	Mn	Cu	Mg	Ca
Контроль (сорт Куяльник)	13а	33а	33а	2,80а	911а	372а
№ 18.2	25в	58д	65г	5,87в	1723г	560г
№ 50.5	17б	46в	47б	4,45б	1257в	399а
№ 51.5	20б	69е	49б	4,09б	1329в	444б
№ 94.4	33г	48в	49б	4,36б	1268в	465в
№ 98.3	21в	57г	52в	4,22б	1351в	403б
№ 104.5	19б	53г	52в	4,37б	1279в	494в
№ 125.5	29г	48в	48б	4,76б	1377в	492в
№ 158.5	22в	40б	45б	4,59б	1023б	434б

Примітка: тут і в табл. 5.3 однаковими буквами позначені варіанти, що не відрізняються за 0,05 рівня значущості.

Середній вміст цинку серед дослідних зразків складає 23,25 мг/кг сухої маси, що на 78% більше, ніж у вихідного контролю (сорт Куяльник). Максимальне накопичення цинку спостерігається у зразка № 94.4 і складає 33 мг/кг, що на 155% більше ніж у контрольного сорту. Мінімальне накопичення цинку визначено у зразка пшениці № 50.5 – 17 мг/кг сухої

речовини, проте, навіть цей рівень вмісту достовірно перевищував результат контрольного варіанту.

Показники вмісту заліза у гомозиготних зразках було дещо вищим, порівняно з аналогічними показниками для цинку. Середній вміст заліза серед дослідних зразків складав 52,3 мг/кг сухої речовини, що, в свою чергу, більше на 61% ніж у вихідного сорту Куяльник. Максимальний вміст заліза спостерігали у зразка № 51.5 – 69,0 мг/кг, мінімальний – у зразка № 158.5 – 40,0 мг/кг.

Середня концентрація мангану серед дослідних зразків, складає 50,7 мг/кг сухої речовини, що на 55% більше ніж у вихідної лінії. Максимальний вміст мангану спостерігався у зразка № 18.2 – 65,0 мг/кг, мінімальний – у зразка № 158.5 з показником 45,0 мг/кг.

Зважаючи на біологічну значимість інших 2-х валентних катіонів, детектували й вміст міді, а також магнію та кальцію. Це теж важливі елементи, підвищений вміст яких визначає посівні якості насіння та харчову цінність борошна з цієї пшениці. Вміст міді у зерні був підвищеним в усіх перерахованих в таблиці варіантах, проте не досягав величини обмеження накопичення (10,0 мг/кг), яка регламентується законодавчо згідно ДСТУ 3768-2010. Також, визначено підвищений вміст магнію у зерні та у більшості ліній – кальцію. Середня кількість магнію, у порівнянні з вихідною лінією, була більша на 46%, кальцію – на 24%, міді – на 64%.

За результатами ICP-MS аналізу вмісту Zn, Fe, Mn, Cu, Mg та Ca в усіх дослідних зразках визначено підвищений вміст мікроелементів, порівняно із сортом Куяльник. Це підтверджує попередні дослідження [129, 134], що ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* позитивно впливає на вміст макро – та мікроелементів у його носіїв.

У 2016 році був проведений аналіз зразків F₅ покоління. Для досліджень брали зерна на молочній фазі дозрівання. Контролем була батьківська лінія (сорт Куяльник). Завданням досліджень було визначити, ступінь накопичення кількості мікро- та макроелементів у зразках – носіях

гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* на початковій фазі дозрівання зерна. Аналіз проводили на 6 лініях, що досліджувалися й у 2015 році. Отримані дані наведені у табл. 5.3.

Таблиця 5.3. Вміст мікро- та макроелементів у зернівках пшениці на початкових стадіях дозрівання, урожаю 2016 року, (мг/кг сухої речовини)

Варіант, лінія	Мікроелементи					Макроелементи
	Zn	Fe	Mn	Cu	Se	Mg
Контроль (сорт Куяльник)	21a	27a	49a	4,2a	0,09a	1665a
№ 18.2	24б	29a	63в	5,0	0,41в	1682a
№ 51.5	27в	32в	60б	5,0	0,23б	1631a
№ 94.4	26в	28a	59б	5,2	0,03a	1681a
№ 98.3	33Г	29б	63в	6,0	0,14a	1853б
№ 104.5	24a	27a	65в	5,8	0,11a	1648a
№ 125.5	31Г	30в	77Г	7,2	0,26б	1960в

Вміст цинку в зразках в середньому становив 27,6 мг/кг сухої речовини, що на 28% більше ніж у вихідної лінії. Максимальний вміст спостерігається у зразка № 98.3 – 33 мг/кг.

Середній вміст заліза у зразках 2016 року становив 28,7 мг/кг сухої речовини, тоді як у зернівках контролю – 27,0 мг/кг (різниця 8%). Максимальний вміст заліза спостерігався у зразках № 51.5 – 32,0 мг/кг, мінімальний вміст у № 104.5 – 27,0 мг/кг. Невелику різницю можна пояснити тим, що зерна ще не були дозрілі й накопичення заліза в колосі ще тривало до повного дозрівання зерна.

Середня концентрація мангану серед дослідних зразків, складала 64,6 мг/кг, що на 31% більше ніж у вихідної лінії сорту Куяльник. Максимальний вміст мангану у зразка № 125.5 – 77 мг/кг, тоді як мінімальний вміст у лінії № 94.4 – 59 мг/кг сухої речовини.

Проаналізувавши показники вмісту двох поколінь F₄ і F₅ на вміст Zn, Mn, Fe можна зробити висновки, що ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* суттєво підвищує вміст даних мікроелементів у дослідних зразках. Цей ефект спостерігається навіть на початкових стадіях дозрівання зерна. Також нами було визначено вміст Cu і Mg в дослідних сім'ях.

Середні значення вмісту міді у лініях перевищують на 35% вміст у вихідного сорту Куяльник, тоді як вміст магнію перевищує на 5%. Підвищений вміст елементів на такій ранній стадії свідчить про те, що ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* поліфункціональний і підвищує вміст не лише Fe, Mn, Zn, а й Cu, Mg.

Одним із важливих мікроелементів для пшениці також є селен. Він є складовим компонентом у понад 30 життєво важливих біологічно активних сполук організму людини, і входить в активні центри ферментів системи антиоксидантного захисту організму, метаболізму нуклеїнових кислот, ліпідів, гормонів. Серед продуктів рослинного походження головним джерелом селену в Україні є пшеничне борошно, тому контроль вмісту селену є надзвичайно важливим [198, 199].

Середній вміст селену в дослідних зразках складає 0,207 мг/кг сухої речовини, що на 117% більше ніж у батьківській лінії. Максимальний вміст селену спостерігається у лінії № 18.2 – 0,41 мг/кг (у 4,5 разів більше контролю) у сухій речовині.

За результатами досліджень 2015 і 2016 років нами встановлено, що присутність гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* у лініях м'якої озимої пшениці, співвідносячись із спостереженнями інших дослідників на ряді зернових колосових культур [40, 190], зумовлює статистично (на рівні 0,05) значуще підвищення рівня накопичення важливих біологічно значимих елементів живлення – заліза, цинку, марганцю, міді, селену, а також магнію. Зважаючи на значення заліза, цинку, марганцю, міді та селену у редокс-гомеостазі, можна передбачити вищі посівні якості насіння зернових, що містять даний ген, а також підвищення резистентності рослин до збудників

шкодочинних хвороб – *Fusarium* spp. тощо. Збагачення іонами міді може сприяти формуванню сходів культур з підвищеними рівнями ефективності використання азоту.

Таким чином, присутність локусу *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* та його функціонування є важливим для біофортificaції пшениці м'якої озимої та подальших селекційних робіт.

Висновки до розділу 5

1. Проведений комплексний аналіз визначення вмісту загально білка в дослідних зразках пшениці F₅ покоління методом К'ельдаля та NIR. В результаті даного аналізу було встановлено, що присутність гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в зразках популяції пшениці підвищує вміст білка на 14% у порівнянні з вихідним сортом Куяльник.
2. Проведено аналіз дослідних зразків пшениці F₄ і F₅ покоління на вміст макро- і мікроелементів методом ICP-MS. В результаті проведеного аналізу встановлено, що присутність гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в зразках зумовлює статистично (на рівні 0,05) значуще підвищення рівня накопичення важливих біологічно значимих елементів – заліза, цинку, марганцю, міді, селену, а також магнію.
3. Публікації за результатами роботи розділу [200, 201].

РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ВРОЖАЙНОСТІ ТА СЕЛЕКЦІЙНИХ ПОКАЗНИКІВ ЛІНІЙ-НОСІЇВ ГЕНА *Gpc-B1* ВІД *TRITICUM* *TURGIDUM* SSP. *DICOCCOIDES*

Врожайність – це один із важливих факторів оцінки якості сортів будь-яких злакових культур. Зразки пшениці - носії гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* теж мають бути оцінені за даним показником, так як сорт, що в майбутньому буде отриманий має бути конкурентним і економічно вигідним для вирощування. Крім підвищеного вмісту білка, заліза, цинку і мангану лінії - носії гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* мають бути стійкими до хвороб, стійкими до полягання і мати гарне виповнено зерно. Проаналізувавши отримані нами експериментальні дані за вмістом білка, мінеральних елементів, алелів генів *Glu-1* та пуринодолінових генів, для комплексного дослідження необхідних фізіологічних показників та якості ліній пшениці в кількості 13 зразків були висаджені ділянками 10м² з нормою висіву 160 гр. В якості контролів були висаджені батьківські лінії сорт Куяльник та лінія Glupro, донор гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Посів проводили сівалкою на базі Дослідного сільськогосподарського виробництва Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (сmt Глеваха Київської обл.).

Даний етап дослідження ліній пшениці є досить важливим, адже батьківська лінія Glupro є низькорослою і маловрожайною, хоч і має високий вміст білка і мікроелементів. Материнський сорт Куяльник – це середньоросла високоврожайна озима пшениця, районована в Україні. Тому, основною цілю було відібрати лінії високопродуктивні і фенотипово схожі на сорт Куяльник, але з підвищеним вмістом білка та мікроелементів у зерні.

На рис. 6.1 зображено колоски сорту Куяльнику, лінії №68 і лінії Glupro – донор гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Лінія №68,

має типові колоски, як і в більшості ліній, що були висаджені ділянками 10м².



Рис. 6.1 Колосся А) сорту Куяльник; Б) лінія пшениці №68; В) лінія Glupro – донор гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

На рисунку добре видно, що колосся сорту Куяльник і лінії пшениці за розміром і структурою схожі між собою, тоді як колосся лінії Glupro суттєво відрізняється за розміром від дослідної лінії і сорту Куяльник. В середньому довжина колоса сорту Куяльник і дослідних ліній становить 8-9 см, тоді як довжина колоса лінії Glupro в середньому 6-7 см. Колоси всіх дослідних ліній – носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* були остистими. Важливим характеристикою є ще те, що лінія Glupro – донор гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* є ярою, тоді як сорт Куяльник є озимим. Всі лінії висівалися, як озимі форми. Після перезимівлі, була 100% схожість рослин, що свідчить, про озимість дослідних ліній.

Після дозрівання пшениці, зерно з ділянок було обмолочене зважене і зібране в мішки. Кожна ділянка обмолочувалася окремо і після кожного зразка проходила чистка і продування молотарки, для унеможливлення змішування зразків ліній пшениці – носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum*

ssp. *dicoccoides*. На рис. 6.2 зображено зерно з ліній пшениці № 68 та сорту Куяльник і лінії Glupro.



А)

Б)

В)

Рис. 6.2. Обмолочене зерно: А) лінії Glupro – донор гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*; Б) лінії пшениці № 68; В) сорту Куяльник.

Зерно сорту Куяльник і ліній пшениці – носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, що були висаджені ділянками 10м², суттєво відрізняється від лінії Glupro. За фенотиповими показниками зернівки лінії Glupro менш виповненні, мають більш зморшкувату структуру і відсутній блиск оболонок зернівки, тоді як зернівки дослідних ліній добре виповненні і мають гарний природний блиск і схожі за зовнішнім виглядом до зернівок сорту Куяльник.

Селекційні показники ліній представлені в таблиці 6.1.

Таблиця 6.1 Селекційні показники ліній - носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*

№	Походження	Перезимівля	Стійкість до вилягання	Остистість форм	Висота рослин
14	Glupro× Куяльник	+	Стійка	Остиста	63 см
38	Glupro× Куяльник	+	Стійка	Остиста	80 см

№	Походження	Перезимівля	Стійкість до вилягання	Остистість форм	Висота рослин
39	Glupro [×] Куяльник	+	Стійка	Остиста	68 см
41	Glupro [×] Куяльник	+	Стійка	Остиста	63 см
45	Glupro [×] Куяльник	+	Стійка	Остиста	62 см
64	Glupro [×] Куяльник	+	Стійка	Остиста	62 см
66	Glupro [×] Куяльник	+	Стійка	Остиста	65 см
67	Glupro [×] Куяльник	+	Стійка	Остиста	70 см
68	Glupro [×] Куяльник	+	Стійка	Остиста	60 см
75	Glupro [×] Куяльник	+	Стійка	Остиста	68 см
80	Glupro [×] Куяльник	+	Стійка	Остиста	70 см
81	Glupro [×] Куяльник	+	Стійка	Остиста	69 см
86	Glupro [×] Куяльник	+	Стійка	Остиста	67 см
	Куяльник	+	Стійка	Остиста	72 см
	Лінія Glupro	Яра форма	Стійка	Остиста	45 см

Примітки: «+» - 100% схожість рослин після перезимівлі.

Селекційні показники, знімалися у польових умовах, а контроль за лініями проходив регулярно впродовж усього вегетаційного періоду. Перезимівля рослин у старших поколіннях зазвичай проходила добре. Лінія Glupro, маючи ярий тип розвитку, висівалася у квітні.

Внаслідок вилягання посівів порушується нормальний ріст і розвиток рослин, зменшуються розміри фотосинтезуючої поверхні, сповільнюється засвоєння елементів живлення та води, що спричинює значні втрати врожаю. Тому для нас було важливо відібрати лінії, що були стійкими, до вилягання.

Всі лінії – носії гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* були стійкими до вилягання, враховуючи що висота рослин коливалася від 60 см до 80 см у різних лініях. Одна з характеристик, яку відслідкували, була наявність остей у колосів, всі ліній в тому числі і батьківські форми були остистими. Форма колосів з остями представлена на рис. 6.1.

Після дозрівання пшениці зерно було обмолочене і зважене. Також з ділянок було зібрано по 100 колосків, їх було теж обмолочено і зважено. В зібраному зерні було визначено вміст білка методом інфрачервоної спектроскопії, а також визначено індекс седиментації за методом SDS-30. Результати аналізу наведено в табл. 6.2.

Таблиця 6.2 Результати аналізу якісних показників пшениці ліній носіїв *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*

№	Походження	Вага 100 колосків, г	Врожайність, ц/га	Вміст білка, %	SDS-30, мл
14	Glupro× Куяльник	265	50,5	13,2	80
38	Glupro× Куяльник	269	44,9	12,9	82
39	Glupro× Куяльник	273	34,7	14,4	50
41	Glupro× Куяльник	277	49,0	13,4	86
45	Glupro× Куяльник	240	36,7	14,0	93
64	Glupro× Куяльник	297	35,4	14,1	93
66	Glupro× Куяльник	286	44,4	14,4	93
67	Glupro× Куяльник	320	54,4	12,5	80
68	Glupro× Куяльник	279	47,5	13,0	91

№	Походження	Вага 100 колосків, г	Врожайність, ц/га	Вміст білка, %	SDS-30, мл
75	Glupro× Куяльник	246	37,4	14,3	94
80	Glupro× Куяльник	275	39,4	13,3	89
81	Glupro× Куяльник	241	41,4	13,8	93
86	Glupro× Куяльник	275	43,4	14,1	90
	Куяльник	380	55,6	10,8	93
	Лінія Glupro	210	30,7	14,9	92

Зібрані 100 колосів на ділянці були обмолочені і зважені. Зерно з цих колосків буде використане для посіву на наступний рік. Такий метод відбору дає можливість унеможливити засмічення цінних ліній під час обмолоти комбайном.

Врожайність з ділянки 10 м² розраховували за формулою:

$$B = \frac{x * 1000}{100},$$

де B – врожайність (ц/га), 1000 – коефіцієнт переведення 10 м² в 1 га, 100 – коефіцієнт переведення кг в центнер.

Середня урожайність в Київській області озимої пшениці в 2017 році склала 36,1 ц/га. Урожайність – це фактор, який залежить від багатьох показників, таких як сорт пшениці, тип ґрунту, кількість опадів, термін висіву (яра, озима пшениця), мінерального живлення. Врожайність в нашому випадку доцільно порівнювати з батьківськими формами: сорт Куяльник, урожайність 55,6 ц/га і лінія Glupro урожайність 30,7 ц/га. Лінія Glupro є ярою формою, тому частково низька врожайність пов'язана з цим фактором. Серед 13 ліній пшениці – носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, можна обрати п'ять з найкращою врожайністю, що наближається

до сорту Куяльник це №14 – 50,5 ц/га, №38 – 44,9 ц/га, №41 – 49 ц/га, №67 – 54,5 ц/га і №68 – 47,5 ц/га. Порівнюючи с середньою врожайністю в Київській області, серед досліджуваних ліній тільки дві мали врожайність менше, це №39 – 34,7 ц/га і №64 – 35,4 ц/га. Отримані результати врожайності є тільки першим етапом у дослідженні фактора врожайності для цих ліній пшениці, для кращої достовірності бажано мати результати за три роки. Врожайність – це важливий економічний фактор, але на ринку України досить велика вже є кількість високоврожайних сортів пшениці, тому у нас на меті відібрати лінії, які мають унікальні показники вмісту білка, мінеральних елементів і звичайно не поступаються врожайності сортів озимої пшениці.

В досліджуваних лініях пшениці методом інфрачервоної спектроскопії було виміряно вміст білка. У вигляді контролів виступили сорт Куяльник в якого вміст білка склав 10,8%, тоді як у лінії Glupro вміст білка 14,9%. Порівнюючи з даними визначення білка методом інфрачервоної спектроскопії 2016 року, коли сорт Куяльник – 13,49%, а лінія Glupro 16,90% помітно, що вміст білка значно менший. Даний факт пов'язаний з несприятливими погодніми умовами, а особливо з малою кількістю опадів. Відсутність достатньої кількості опадів вплинуло не лише на вміст білка, а й на загальну врожайність зернових культур.

Серед 13 ліній пшениці – носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, які ми досліджували, вміст білка більше 14% спостерігався у 6-ти, а саме №39 – 14,4% , №45 – 14,0%, №64 – 14,1%, №66 – 14,4%, №75 – 14,3% і №86 – 14,1%. За показником якості вмісту білка, дані лінії, відносяться до 1 класу зерна. Порівнюючи вміст білка цих 6-ти ліній з сортом Куяльник, в середньому вміст білка підвищений на 30%, що є досить суттєвим показником. Дослідні лінії пшениці, в яких вміст білка не менше 12,5%, а це 7 ліній №14 – 13,2%, №38 – 12,9%, №41 – 13,4%, №67 – 12,5%, №68 – 13,0%, №80 – 13,3% і №81 – 13,8%, відносяться до 2 класу зерна. Порівнюючи вміст білка дослідних ліній з вмістом білка менше 14% з

вихідною лінією сортом Куяльник, видно що в середньому вміст підвищений на 21%, що є теж хорошим результатом. Отримані результати в 2017 році кращі, в порівнянні з 2016 роком, так як у 2016 році підвищений вміст білка серед досліджуваних ліній і сорту Куяльник був в середньому на 14%. Проаналізувавши результати вмісту білка в лініях - носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* за 2 роки, помітно, що цільовий ген дійсно позитивно впливає на вміст білка в досліджуваних лініях, а дана властивість успішно передається в наступні покоління.

Нами було проведено аналіз хлібопекарської якості пшениці за методом непрямой оцінки «сили» борошна – індексом седиментації SDS-30. Метод заснований на створенні оптимальних умов для активації власних ферментів і ферментів борошна, що і відбувається при приготуванні тіста, тобто показник седиментації вказує фактичну «силу» білково-протеїназного комплексу. Клейковину можна вважати сильною, якщо вона володіє високими хлібопекарськими якостями і якщо величина показника седиментації більше 45 мл, середньої якості – 36-45 мл і слабкою при менше 36 мл.

Серед 13 ліній індекс седиментації SDS-30 у більшості зразків був більше 80 мл, за виключенням лінії №39 в якій він склав 50 мл. П'ять досліджуваних ліній пшениці – носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* мали коефіцієнт седиментації такий же високий, як і у вихідного сорту Куяльник: це лінії №45 – 93мл, №64 – 93 мл, №66 – 93 мл, №75 – 94 мл, №81- 93 мл. Високий індекс седиментації SDS-30, вказує на високу хлібопекарську якість борошна.

Підводячи підсумок аналізу врожайності та фізіологічних показників дослідних ліній – носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* можна зробити висновки, що лінії є стійкими до полягання, середньорослими з середньою врожайністю, що навіть краще за середню врожайність сортів озимої пшениці 2017 року, цього ж регіону. Вміст білка в досліджуваних лініях є досить високим і на 20-30 % більше ніж у вихідного сорту Куяльник,

в деяких лініях наближається до лінії Glupro, яка є донором гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, що направлений на підвищений вміст білка. Індекс седиментації SDS-30 у дослідних ліній є високим і коливається від 50 до 94мл. Даний показник вказує на високу якість хлібопекарських властивостей ліній. Проаналізувавши всі показники, добре видно, що дослідні лінії - носії гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* є унікальним генетичним матеріалом, який поєднує в собі найкращі властивості від своїх батьків і в подальшому будуть викостані для створення нових високоперспективних сортів.

Висновки до розділу 6

1. Проведено аналіз врожайності та фізіологічних показників ліній м'якої пшениці F₆ покоління - носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. В результаті дослідження було встановлено, що дослідні лінії є стійкими до полягання, середньорослими з середньою врожайністю 43 ц/га, що краще за середню врожайність сортів озимої пшениці 2017 року, що склала 36,1 ц/га цього ж регіону, та на 40% більше ніж у вихідної лінії Glupro.
2. Проведено аналіз хлібопекарської якості пшениці за методом непрямой оцінки «сили» борошна – індексом седиментації SDS-30. У більшості дослідних ліній, індекс седиментації склав більше 80мл, що свідчить про високу хлібопекарську якість борошна з дослідних ліній пшениці, носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

РОЗДІЛ 7. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

На сьогоднішній день в світі існує одна із гострих проблем харчування населення, що пов'язано з недоїданням поживних речовин, вітамінів, мінералів. Найбільш ефективний і вигідний спосіб вирішення цієї проблеми – це біофортificaція сільськогосподарських рослин. Пшениця одна із основних зернових культур, що забезпечує близько 20-30% щоденного споживання калорій у європейських країнах і близько 50% у Центральній Азії [11]. Біофортificaція пшениці – це важливий напрямок покращення якості пшениці, а як наслідок, покращення харчових продуктів, що з неї виробляються. Процес біофортificaції об'єднує в собі процес селекційного відбору і молекулярно-генетичного дослідження.

Молекулярні маркери є невід'ємною частиною селекційного процесу. Це унікальний інструмент молекулярної генетики, який дає можливість швидкої ідентифікації генотипів та цінних генів, які впливають на фізіологічні та якісні показники, що є надзвичайно важливими для роботи з гібридними лініями, та створенням нових сортів пшениці.

Складність у процесі підвищення у зерні вмісту загального білка викликаний високим екзогенним ефектором нового генетичного матеріалу і складністю комплексу генетичних систем, що регулюють процес вбудовування нового генетичного матеріалу і його передачу наступним поколінням [120]. Вміст мікроелементів в зерні пшениці детермінується генетично та залежить від факторів навколишнього середовища. Одним із перспективних генів, що був знайдений в дикому еммері (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*) є ген *Gpc-B1*. Ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* є важливим регулятором процесу старіння, транслокації білків та мікроелементів [132,133].

В нашій роботі донором гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* була гексаплоїдна лінія Glupro, яка була схрещена з високопродуктивним сортом української селекції Куяльник. В результаті

схрещування були отриманні зразки популяції, дослідження з якими ми й проводили.

У роботі було розроблено кодомінантну та домінантну молекурно-генетичні системи ДНК маркерів для ідентифікації гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, та дослідження його стану, гетерозиготного, гомозиготного. Розроблені системи були використані, для відбору зразків озимої пшениці з F₂ по F₅ покоління. За допомогою розроблених систем було проведено селекційний відбір 13 найкращих ліній, що є цінним генетичним матеріалом для української селекції.

Розроблено чотири кодомінантних молекулярно-генетичних системи маркерів до SSR локусів *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm626* і *Xgwm219*, що розташовані на 6В хромосомі. Молекурно-генетичні системи були використані для генетипування 6В хромосоми F₃ покоління зразків пшениці – носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Результати аналізу за вище перерахованими локусами, дали можливість обрахувати частоту рекомбінації на 6В хромосомі за локусами *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm626* і *Xgwm219*. Отримані результати, дають можливість оцінити зразки наскільки вони генотипово схожі на вихідний сорт Куяльник. Оскільки одним із завдань було відібрати зразки популяції, що за генотипом максимально схожі на культурну пшеницю сорту Куяльник.

Важливим показником хлібопекарської якості пшениці є клейковинні білки глютеніни і гліадини, які загалом складають близько 80-85% від загального вмісту білка в зерні [186]. Найбільш цінним білком для хлібовипічки є глютеніни. Визначення алельного стану генів *Glu-1*, проводили в лініях покоління F₅, які є носіями гена *Gpc-B1* від дикого еммера *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. За трьома локусам *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* виявлено 16-ть найбільш цінних ліній. Вони містять оптимальну для хлібопекарської якості алельну формулу локусу *Glu-1* (*Glu-A1a* або *Glu-A1b*, *Glu-B1a1*, *Glu-D1d*).

Одним із важливих показників оцінки зерна пшениці є текстура ендосперму, яка вирішує напрямок використання пшеничної муки, тобто мука з м'якозерної пшениця краща для випікання бісквітів і печива, а мука з твердозерних сортів є цінною для хлібопекарської промисловості. На твердозерність пшениці впливають пуріндолінові білки, які контролюються кількома зчепленими генами, пуроіндолін *a* (ген *Pina-D1*), пуроіндолін *b* (ген *Pinb-D1*) та Grain Softness Protein (ген *Gsp-1*) [180, 181, 182]. Фізичний показник твердозерності, можна визначити за допомогою інфрачервоної спектроскопії. Комплексний аналіз ліній з визначення тестури ендосперма показав, що наявність комбінації алелей *Pina-D1b*, *Pinb-D1a* підвищує твердість ендосперму, тоді як наявність алелей *Pina-D1a*, *Pinb-D1b* характерно для м'якозерних ліній. Велику цінність представляють лінії, що мають комбінацію алелей *Pina-D1b*, *Pinb-D1a*, так як дана комбінація є більш перспективною для хлібопекарських сортів пшениці, а також не була виявлена у сортах пшениці української селекції.

Важливим показником при оцінці зерна пшениці є вміст білка. Визначення вмісту загального білка в лініях пшениці F₅ покоління проводили паралельно двома сучасними методами: методом інфрачервоної спектрометрії (NIR) та методом К'ельдаля. Дослідні лінії F₅ покоління носії гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в середньому за двома методами, мали підвищений вміст загального білка на 14% в порівнянні з вихідним сортом Куяльник. Отримані результати підтверджують результати інших дослідників про те що наявність ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* підвищує вміст білка.

Проблема нестачі в раціоні харчування важливих мінеральних елементів є актуальною більше чим для двох мільярдів людей в усьому світі. [23,116]. Одним з підходів вирішення цієї проблеми, це біофортificaція. Лінії озимої пшениці з якими ми працювали були біофортифіковані геном *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, який підвищує вміст Zn, Fe й Mn. Визначення вмісту макро і мікроелементів в лініях проводили за

сучасним методом мас-спектрометрії з індуктивно зв'язаною плазмою ICP-MS. Аналіз за два роки дійсно показав, що лінії - носії гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* мають підвищений вміст Zn, Fe й Mn в порівнянні в вихідним сортом Куяльник. Також, при аналізі ліній було помічено підвищений вміст таких елементів, як Cu, Mg і Se, що є також важливими елементами метаболізму людини.

Однієї із задач оцінки дослідних ліній - носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* було оцінити їх врожайність та фізіологічні показники. Врожайність оцінювали на ділянках 10м². Серед 13 дослідних ліній пшениці носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, що були висаджені в контрольне випробування на ділянки, можна обрати п'ять з найкращою врожайністю, що наближається до сорту Куяльник у якого врожайність – 55,6 ц/га, №14 – 50,5 ц/га, №38 – 44,9 ц/га, №41 – 49 ц/га, №67 – 54,5 ц/га і №68 – 47,5 ц/га. Було проведено аналіз хлібопекарської якості пшениці за методом не прямої оцінки «сили» борошна – індексом седиментації SDS-30. У більшості ліній індекс седиментації SDS-30, склав більше 80 мл, що загалом є чудовим результатом, враховуючи, що гарна сила борошна вважається більше 45мл.

Підводячи підсумок, можна зробити висновок, що такий комплексний підхід до аналізу зразків популяції, дає можливість повноцінно оцінити і відібрати зразки, що є носіями гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* з необхідним генетичним матеріалом і фенотиповим проявом. В результаті такої схеми аналізу зі 160 дослідних ліній відібрали 13-ть, що є цінними і найперспективнішими для подальших селекційних робіт.

ВИСНОВКИ

Виконані комплексні дослідження генетичних ефектів гена *Gpc-B1*, інтродукованого з *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, дозволили започаткувати технологію добору ліній м'якої озимої пшениці, у яких поліпшена якість зерна. Застосована біотехнологія маркер-залежної селекції забезпечила створення новітнього селекційного матеріалу пшениці з підвищеним вмістом білка та корисних мікроелементів у зерні у поєднанні з високими господарсько цінними властивостями рослин.

1. Розроблено домінантну та кодомінантну молекулярно-генетичні системи ДНК-маркерів для виявлення гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в рослинах м'якої озимої пшениці.
2. Розроблено чотири кодомінантні молекулярно-генетичні системи ДНК-маркерів до SSR локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*, що розташовані на 6В хромосомі і обраховано частоту рекомбінації локусів, яка становить для $Xgwm508 = 2,94 \pm 1,28 \%$, $Xgwm193 = 3,96 \pm 1,51\%$, $Xgwm626 = 2,98 \pm 1,29\%$, $Xgwm219 = 6,77 \pm 2,08\%$.
3. В результаті проведеного аналізу алелів генів глютенінів рослин пшениці F_5 покоління було відібрано 16 найбільш цінних ліній, що містять оптимальну для хлібопекарської якості алельну формулу локусу *Glu-1* (*Glu-A1a* або *Glu-A1b*, *Glu-B1a1*, *Glu-D1d*).
4. При аналізі алельного стану пуринолінових генів у рослинах F_5 покоління, носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, було виявлено 17-ть ліній з 44-х, що мали алельний стан аналогічний до материнського сорту Куяльник, а також 12-ть унікальних ліній, що несли комбінацію алелів *Pina-D1b*, *Pinb-D1a*, не притаманну сортам української селекції
5. Комплексний аналіз вимірювання вмісту загального білка зернівок у рослин F_5 покоління методом К'ельдаля та NIR, встановив, що завдяки гену

Gpc-B1 від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* підвищується вміст білка на 14% у порівнянні з вихідним сортом Куяльник.

6. Аналіз рослин F₄ і F₅ поколінь на вміст біологічно важливих елементів методом ICP-MS, встановив, що присутність гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* зумовлює статистично (на рівні 0,05) значуще підвищення рівня накопичення у зернівках заліза, цинку, марганцю, міді, селену та магнію.

7. Оцінювання врожайності та селекційних показників ліній пшениці F₆ покоління, носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, встановило їх стійкість до полягання та середню врожайність на рівні 43 ц/га.

8. Розроблена технологія відбору ліній пшениці озимої з геном *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, направлена на поліпшення ознак якості зерна, була впроваджена у вітчизняних селекційних програмах Інституту фізіології рослин і генетики НАН України та Селекційно генетичного інституту – Національному центрі насіннізнавства та сортовивчення НААН України (акти впровадження від 28.03.2018 та 01.04.2018).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Straeten D. V. Editorial overview: Biofortification of crops: achievements, future challenges, socio-economic, health and ethical aspects / D. V. Straeten, T. B. Fitzpatrick, H. D. Steur. // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2017. – V.44. – P. 7–10.
2. Stover P. J. Editorial overview: Food biotechnology / P. J. Stover, S. O. Mehta. // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2017. – V.44. – P. 5–6.
3. The State of Food Insecurity in the World [Електронний ресурс] // FAO. – 2015. – Режим доступу до ресурсу: <http://www.fao.org/3/a-i4646e.pdf>.
4. Bioversity International's 10-year strategy 2014-2024 [Електронний ресурс] // Bioversity International. – 2014. – Режим доступу до ресурсу: https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/Bioversity_International_Strategy_2014-2024_1766.pdf.
5. Zilic S. Characterization of proteins from grain of different bread and durum wheat genotypes / S. Zilic, M. Barac, M. Pesic et. all // *Int. J. Mol. Sci.*. – 2011. – V.12(9). – P. 5878–5894.
6. Маханьова Ю. М. Експорт зернових культур України, ЄС і країн світу в умовах сучасних інтеграційних процесів / Ю. М. Маханьова // *Проблеми економіки*. – 2015. – №1. – С. 27–36.
7. Рибалка О. І. Сучасні дослідження якості зерна пшениці у світі: біосинтез і накопичення запасних білків, структура, агрегація і реологія у зв'язку з технологією зернопродуктів / О. І. Рибалка, Б. В. Моргун, В. М. Починок // *Фізіологія і біохімія культурних рослин*. – 2011. – Т. 43, №6. – С. 463-477.
8. Рибалка О. І. Сучасні дослідження якості зерна пшениці у світі: генетика, біотехнологія та харчова цінність запасних білків / О. І. Рибалка, Б. В. Моргун, В. М. Починок // *Фізіологія і біохімія культурних рослин*. – 2012. – Т. 44, №1. – С. 3-22.

9. Бурлака О. М. Біофортифікація сільськогосподарських рослин / О. М. Бурлака, Б. В. Сорочинський // Біотехнологія. – 2010. – №5. – С. 31-42.
10. Laureates World Food Prize [Електронний ресурс] // World Food Prize. – 2016. – Режим доступу до ресурсу https://www.worldfoodprize.org/en/laureates/2016__andrade_mwanga_low_and_bouis/.
11. Micronutrient contents and nutritional values of commercial wheat flours and flours of field-grown wheat varieties — A survey in Hungary / [F. Szira, I. Monostori, G. Galiba et al.]. // Cereal Research Communications. – 2014. – V.42. – P. 189–198.
12. Biofortification of crops with nutrients: factors affecting utilization and storage. / [J. Diaz-Gomez, R. M. Twyman, C. Zhu et al.]. // Current Opinion in Biotechnology. – 2017. – V.44. – P. 115–123.
13. Giuliano G. Provitamin A biofortification of crop plants: a gold rush with many miners. / G. Giuliano // Current Opinion in Biotechnology. – 2017. – V.44. – P. 169–180.
14. Metabolic engineering of wheat provitamin A by simultaneously overexpressing CrtB and silencing carotenoid hydroxylase (TaHYD). / [J. Zeng, X. Wang, Y. Miao et al.]. // J Agric Food Chem. – 2015. – V.63 (41). – P. 9083–9092.
15. Distinct expression and function of carotenoid metabolic genes and homoeologs in developing wheat grains / [X. Qin, K. Fischer, S. Yu et al.]. // BMC Plant Biology. – 2016. – V.16. – P. 1–15.
16. Goyer A. Thiamin biofortification of crops. / A. Goyer // Current Opinion in Biotechnology. – 2017. – V.44. – P. 1–7.
17. Rationalising vitamin B6 biofortification in crop plants. / [J. Fudge, N. Mangel, W. Gruissem et al.]. // Current Opinion in Biotechnology. – 2017. – V.44. – P. 130–137.

18. Seizures related to vitamin B6 deficiency in adults / [L. Dong-Gun, L. Yeonkyung, S. Hyeen et al.]. // Journal Epilepsy Research. – 2015. – V.5(1). – P. 23–24.
19. Effects of vitamin B6 metabolism on oncogenesis, tumor progression and therapeutic responses / [L. Galluzzi, E. Vacchelli, J. Michels et al.]. // Oncogene. – 2013. – V.32. – P. 4995–5004.
20. Folates and aging: Role in mild cognitive impairment, dementia and depression. / [J. R. Araujo, F. Martel, N. Borges et al.]. // Ageing Research Reviews. – 2015. – V.22. – P. 9–19.
21. Global burden of neural tube defects, risk factors, and prevention / E. Joseph, A. L. Flores, C. Vellozzi, D. Valencia // Indian Journal of Community Health. – 2014. – V.26. – P. 3–5.
22. Strobbe S. Folate biofortification in food crops / S. Strobbe, D. V. Straeten // Current Opinion in Biotechnology. – 2017. – V.44. – P. 202–211.
23. White P. J. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets-iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. / P. J. White, M. R. Broadley// New Phytologist. – 2009. – V.182. – P. 49–84.
24. Доронін А. В. Сучасний стан зернового ринку в Україні / А. В. Доронін // Наукові праці Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків. – 2014. – №21. – С. 270–276.
25. Shewry P. R. Wheat / P. R. Shewry // Journal of Experimental Botany. – 2009. – V.60. – P. 1537–1553.
26. FAO. FAOSTAT–Agriculture Database. – 2016. – Режим доступу до ресурсу: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
27. Biofortification of cereals to overcome hidden hunger / N. Rawat, K. Neelam, V. Tiwari, H. Dhaliwal // Plant Breeding. – 2013. – V. 132. – P. 437–445.
28. Colangelo E. P. Put the metal to the petal:metal uptake and transport throughout plants / E. P. Colangelo, M. L. Guerinot // Current Opinion in Biotechnology. – 2006. – V.9. – P. 322–330.

29. Hell R. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. / R. Hell, U. W. Stephan // *Planta*. – 2003. – V.216. – P. 541–551.
30. The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice / [R. Takahashi, Y. Ishimaru, T. Senoura et al.]. // *Journal of Experimental Botany*. – 2011. – V.62. – P. 4843—4850.
31. Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. / [C. Curie, Z. Panaviene, C. Loulergue et al.]. // *Nature*. – 2001. – V.409. – P. 346–349.
32. Biofortification of wheat cultivars to combat zinc deficiency / [M. U. Chattha, M. U. Hassan, I. Khan et al.]. // *Front Plant Science*. – 2017. – V.8. – P. 1–8.
33. Cakmak I. Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? / I. Cakmak. // *Plant and Soil*. – 2007. – V.302. – P. 1–7.
34. Biofortification: a new tool to reduce micronutrient malnutrition. / [H. E. Bouis, C. Hotz, B. McClafferty et al.]. // *Food and Nutrition Bulletin*. – 2011. – V.32. – P. 31–40.
35. Maret W. Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals. / W. Maret. // *Biometals*. – 2009. – V.22. – P. 149–157.
36. Prasad A. S. Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. / A. S. Prasad. // *Experimental Gerontology*. – 2008. – V.43. – P. 370–377.
37. Cakmak I. Role of zinc in protecting plant cells from reactive oxygen species / I. Cakmak. // *New Phytologist*. – 2000. – V.146. – P. 185–205.
38. Pandey N. Zinc is critically required for pollen function and fertilisation in lentil. / N. Pandey, G. C. Pathak, C. P. Sharma. // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2006. – V.20. – P. 89–96.
39. Agronomic approach of zinc biofortification can increase zinc bioavailability in wheat flour and thereby reduce zinc deficiency in humans. / [D. Liu, Y. Liu, W. Zhang et al.]. // *Nutrients*. – 2017. – V. 9. – P. 465–472.

40. Biofortification and localization of zinc in wheat grain. / [I. Cakmak, M. Kalayci, Y. Kaya et al.]. // Journal of Agricultural and food chemistry. – 2010. – V.58. – P. 9092–9102.
41. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, Zn, and Fe content in wheat / [C. Uauy, A. Distelfeld, T. Fahima et al.]. // Science. – 2006. – V.314. – P. 1298–1301.
42. Introgression of the high grain protein gene Gpc-B1 in an elite wheat variety of Indo-Gangetic Plains through marker assisted backcross breeding / [M. K. Vishwakarma, V. K. Mishra, P. K. Gupta et al.]. // Current Plant Biology. – 2014. – V.1. – P. 60–67.
43. Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005 [Электронный ресурс] // World Health Organization. – 2008. – Режим доступа до ресурсу: http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/9789241596657/en/.
44. McClung J. P. Iron nutrition and premenopausal women: effects of poor iron status on physical and neuropsychological performance. / J. P. McClung, L. E. Murray-Kolb. // Annual Review of Nutrition. – 2013. – V.33. – P. 271–288.
45. Haas J. D. Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship. / J. D. Haas, T. Brownlie. // Journal Nutrition. – 2001. – V.131. – P. 676–688.
46. New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. / [J. F. Briat, K. Ravet, N. Arnaud et al.]. // Annals of Botany. – 2010. – V.105. – P. 811–822.
47. Global Progress [Электронный ресурс] // Food Fortification Initiative. – 2017. – Режим доступа до ресурсу: http://www.ffinetwork.org/global_progress/.
48. An improved assembly and annotation of the allohexaploid wheat genome identifies complete families of agronomic genes and provides genomic

- evidence for chromosomal translocations. / [B. J. Clavijo, L. Venturini, C. Schudoma et al.]. // *Genome Research*. – 2017. – V.27. – P. 885–896.
49. Vacuolar iron transporter TaVIT2 transports Fe and Mn and is effective for biofortification / [J. M. Connorton, E. R. Jones, L. I. Rodriguez-Ramiro et al.]. // *Plant Physiology*. – 2017. – V.7. – P. 1–29.
 50. Wheat ferritins: Improving the iron content of the wheat grain / S. Borg, H. Brinch-Pedersen, B. Tauris, P. Holm. // *Journal of Cereal Science*. – 2012. – V.56. – P. 204–213.
 51. Zhang Y. Comparative genomics of trace elements: emerging dynamic view of trace element utilization and function. / Y. Zhang, V. Gladyshev. // *Chemical reviews*. – 2009. – V.109. – P. 4828–4861.
 52. Impact of the Nationwide Intravenous Selenium Product Shortage on the Development of Selenium Deficiency in Infants Dependent on Long-Term Parenteral Nutrition. / [C. H. Chen, M. B. Harris, M. L. Partipilo et al.]. // *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. – 2016. – V.40. – P. 851–859.
 53. Meplan C. The influence of selenium and selenoprotein gene variants on colorectal cancer risk. / C. Meplan, J. Hesketh. // *Mutagenesis*. – 2012. – V.27. – P. 177–186.
 54. Pilon-Smits E. A. Selenium in plants. / E. A. Pilon-Smits, U. Luttge, W. Beyschlag. // *Progress in botany*. – 2015. – V.76. – P. 93–107.
 55. Brown T. A. Selenium: toxicity and tolerance in higher plants / T. A. Brown, A. Shrift. // *Biological Reviews*. – 1982. – V.57. – P. 59–84.
 56. Selenium-fortified wheat: potential of microbes for biofortification of selenium and other essential nutrients / M. Yasin, A. F. El-Mehdawi, E. A. Pilon-Smits, M. Faisal. // *International Journal of Phytoremediation*. – 2015. – V.17. – P. 777–786.
 57. QTL mapping of selenium content using a RIL population in wheat. / [P. Wang, H. Wang, Q. Liu et al.]. // *PLoS one*. – 2017. – V.12. – P. 1–10.

58. Opportunities for Products of New Plant Breeding Techniques / J. G. Schaart, C. M. Clemens, A. P. Lambertus, J. M. Marinus. // Trends in Plant Science. – 2016. – V.21. – P. 438–449.
59. Yang L. Endogenous Reference Genes and Their Quantitative Real-Time PCR Assays for Genetically Modified Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Detection. / L. Yang, S. Quan, D. Zhang. // Methods in Molecular Biology. – 2017. – V.1679. – P. 259–268.
60. Sramkova Z. Genetic improvement of wheat-a review / Z.Sramkova, E. Gregova, E. Sturdík. // Nova Biotechnologica. – 2009. – V.9. – P. 27–51.
61. Шелепов В. В. Пшеница: биология, селекция, морфология, семеноводство / Шелепов В. В., Гаврилюк Н. Н., Вергунов В. А. – К.: Логос, 2013. – 498 с.
62. Frequent gene movement and pseudogene evolution is common to the large and complex genomes of wheat, barley, and their relatives. / [T. Wicker, K. F. Mayer, H. Gundlach et al.]. // The Plant Cell. – 2011. – V.23. – P. 1706-1718.
63. Бадаева Е. Д. Структура генома и хромосомный анализ растений / Е.Д.Бадаева, Е. А. Салина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т.17. – С. 1017-1043.
64. Belderok B. Bread-making quality of wheat: A Century of Breeding in Europe / B. Belderok, J. Mesdag, D. Donner. // Springer Science & Business Media. – 2000. – V.3. – P. 1–416.
65. Hedden P. The genes of the Green Revolution / P. Hedden. // Trends in Genetics. – 2003. – V.19. – P. 5–9.
66. Ларченко К. А. Ознаки якості зерна пшениці та методи їх поліпшення / К. А. Ларченко, Б. В. Моргун. // Физиология и биохимия культурных растений. – 2010. – Т.42. – №6. – С. 463–474.
67. Uauy C. Combining traditional mutagenesis with new high-throughput sequencing and genome editing to reveal hidden variation in polyploid wheat. /

- C. Uauy, B. Wulff, J. Dubcovsky. // *Annual Review of Genetics*. – 2017. – V.51. – P. 435–454.
68. Development of a high-efficient mutation resource with phenotypic variation in hexaploid winter wheat and identification of novel alleles in the TaAGP.L-B1 gene / [H. Guo, Z. Yan, X. Li et al.]. // *Front Plant Science*. – 2017. – V. 8. – P. 1–9.
 69. Moiseeva Y. M. Agrobacterium-mediated transformation of maize with antisense suppression of the proline dehydrogenase gene by an in planta method / Y. M. Moiseeva, V. A. Velikov, I. V. Volokhina. // *British Biotechnology Journal*. – 2014. – V. 4. – P. 116–125.
 70. Генетическая трансформация мягкой пшеницы с использованием векторных конструкций, содержащих гены метаболизма пролина / С. С.Воронова, А. Н. Гончарук, А. В. Бавол, О. В. Дубровная. // *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. – 2015. – №1. – С. 28–33.
 71. High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize / [Z. Zhao, W. Gu, T. Cai et al.]. // *Molecular Breeding*. – 2002. – V.8. – P. 323–333.
 72. Agrobacterium-mediated Japonica rice transformation: a procedure assisted by an antinecrotic treatment / [G. Enriquez-Obregon, D. Prieto-Samsonov, G. Riva et al.]. // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 1999. – V.59. – P. 159–168.
 73. Sparks C. A. Genetic transformation of wheat via Agrobacterium-mediated DNA delivery. / C. A. Sparks, A. Doherty, H. D. Jones. // *Methods in Molecular Biology*. – 2014. – V.1099. – P. 235–250.
 74. Hensel G. Agrobacterium-mediated transformation of wheat using immature embryos. / G. Hensel, C. Marthe, J. Kumlehn. // *Methods in Molecular Biology*. – 2017. – V.1679. – P. 129–139.

75. Ziemienowicz A. Agrobacterium-mediated transformation of wheat using immature embryos. / A. Ziemienowicz. // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2014. – V.3. – P. 95–102.
76. Махалин М. А. Межродовая гибридизация зерновых колосовых культур / М. А. Махалин. – М.: Наука, 1992. – 239 с.
77. Богуславский Р. Л. Род *Aegilops* L. как генетический ресурс селекции / Р. Л. Богуславский, О. В. Голик. – Харьков, 2004. – 236 с.
78. Молоцький М. Я. Селекція і насінництво сільськогосподарських рослин: Підручник / М. Я. Молоцький, С. П. Васильківський, В. І. Князюк, В. А. Власенко – К.: Вища освіта, 2006. – 463 с.
79. Ciaffi M. High molecular weight glutenin subunit variation in wild and cultivated einkorn wheats (*Triticum* spp., *Poaceae*) / M. Ciaffi, L. Dominici, D. Lafiandra. // Plant Systematics and Evolution. – 1998. – V.209. – P. 123–137.
80. Witcombe J. A guide to the species of *Aegilops* L. Their taxonomy, morphology and distribution / J. Witcombe // Int. Board Plant Genet. Resour. Wheat Progr. FAO, Rome. – 1983. – P. 1-73
81. Moore G. Cereal chromosome structure, evolution, and pairing. / G. Moore. // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. – 2000. – V.51. – P. 195–222.
82. Леонова И. Н. Генетический контроль устойчивости к грибным болезням у мягкой пшеницы с интрогрессиями от *Triticum timopheevii* zhuk : дис. докт. биол. наук : 03.02.07- Генетика / И. Н. Леонова. – Новосибирск, 2015. – 343 с.
83. Хлесткина Е. К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений / Е. К. Хлесткина // Вавиловський журнал генетики і селекції. – 2011. – Т. 15, № 4. – С. 757-768.
84. Календарь Р. Н. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение / Р. Н. Календарь, В. И. Глазко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2002. – Т.34, №4. – С. 279-295.

85. Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции / Е. К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17, № 4/2. – С. 1044-1054.
86. Development of EST-SSR markers in flowering Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* Tsen et Lee) based on *de novo* transcriptomic assemblies / [J. Chen, L. Ronghua, Y. Xia et al.]. // PLoS one. – 2017. – V12. – P. 1–14.
87. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis / [W. Powell, M. Morgante, C. Andre et al.]. // Molecular Breeding. – 1996. – V.2. – P. 225–238.
88. Landjeva S. Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding / S. Landjeva, V. Korzun, A. Borner. // Euphytica. – 2007. – V.156. – P. 271–296.
89. Леонова И. Н. Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов / И. Н. Леонова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17, № 2. – С. 314-325.
90. Collard B. C. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century / B. C. Collard, D. J. Mackill. // Phil. Trans. R. Soc. B. – 2008. – V.363. – P. 557–572.
91. Somers D. J. Molecular Marker Systems and Their Evaluation for Cereal Genetics / D. J. Somers. // Cereal Genomics. – 2004. – V.2. – P. 19–34.
92. Practical application of genomic selection in a doubled-haploid winter wheat breeding program / [J. Song, B. F. Carver, C. Powers et al.]. // Molecular Breeding. – 2017. – V.37. – P. 117.
93. Molecular mapping and genetic analysis of a QTL controlling spike formation rate and tiller number in wheat / [H. Yang-shan, R. Tian-heng, L.Zhi et al.]. // Gene. – 2017. – V.634. – P. 15–21.

94. Bansal U. Advances in Identification and Mapping of Rust Resistance Genes in Wheat. / U. Bansal, H. Bariana. // *Wheat Rust Diseases*. – 2017. – V.1659. – P. 151–162.
95. Frisch M. Selection theory for marker-assisted backcrossing/ M. Frisch, A.E. Melchinger// *Genetics*. – 2005. – V.170. – P. 909-917.
96. Falke K. C. Selection strategies for the development of rye introgression libraries / K. C. Falke, T. Miedaner, M. Frisch. // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2009. – V.119. – P. 595–603.
97. Marker-assisted development and characterization of a set of *Triticum aestivum* lines carrying different introgressions from the *T. timopheevii* genome / E. M. Timonova, I. N. Leonova, M. S. Röder, E. A. Salina. // *Molecular Breeding*. – 2013. – №31. – С. 123–136.
98. Сиволап Ю. М. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений / Ю. М. Сиволап, Н. Э. Кожухова, Р. Н. Календарь. – Одеса: Астропринт, 2011. – 340 с.
99. Andersen J.R. Functional markers in plants / J. R. Andersen, T. Lubberstedt // *Trends in Plant Science*. – 2003. – V. 8. – P. 554-560.
100. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. / [P. Poczaï, I. Varga, M. Laos et al.]. // *Plant Methods*. – 2013. – V.9. – P. 1–31.
101. Arnholdt-Schmitt B. Functional markers and a 'systemic strategy': convergency between plant breeding, plant nutrition and molecular biology. / B. Arnholdt-Schmitt. // *Plant Physiol Biochem*. – 2005. – V.43. – P. 817–820.
102. Varshney R. K. Genic molecular markers in plants: development and applications. / R. K. Varshney, R. Tuberosa // *Genomic Assisted Crop Improvement* / R. K. Varshney, R. Tuberosa. – New York: Springer Science, 2007. – P. 13–29.
103. Применение молекулярных маркеров в селекции пшеницы в Краснодарском НИИСХ им. П.П. ЛУКЬЯНЕНКО / [Л. А. Беспалова, А. В. Васильев, И. Б. Аблова та ін.]. // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2012. – №1. – С. 37–43.

104. Sorrells M. E. Application of new knowledge, technologies, and strategies to wheat improvement / M. E. Sorrells. // *Euphytica*. – 2007. – V.157. – P. 299–306.
105. William H. M. Wheat breeding assisted by markers: CIMMYT's experience / H. M. William, R. Trethowan, E. M. Crosby-Galvan // *Euphytica*. – 2007 – V.157. – P. 307 – 319.
106. Marker-assisted selection as a component of conventional plant breeding / P. K. Gupta, J. Kumar, R. R. Mir, A. Kumar // *Plant Breed. Rev.* – 2009. – V. 33. – P. 145 – 217.
107. Балашова И. А. Маркирование гена *Ppd-D1a* методом ISSR-ПЦР / И. А. Балашова, В. И. Файт, Ю. М. Сиволап // *Вісник Одеського національного університету*. – 2002. – Т. 7. – С. 100 – 104.
108. Использование RAPD-метода для создания ДНК-маркеров к генам *Vrn* / И. А. Балашова, Ю. М. Сиволап, В. И. Файт, А. Ф. Стельмах. // *Цитология и генетика*. – 2001. – №2. – С. 49–53.
109. Чеботар С. В. Впровадження молекулярних маркерів у дослідження генетичного поліморфізму м'якої пшениці в південному біотехнологічному центрі в рослинництві / С. В. Чеботар. // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – 2015. – №17. – С. 97–102.
110. Молекулярна ідентифікація алеля *Glu-B1a1* у сортах і лініях пшениці / [Б. В. Моргун, Т. В. Чугункова, О. І. Рибалка та ін.]. // *Физиология растений и генетика*. – 2013. – №4. – С. 290–295.
111. Фенотипическое проявление аллелей пурииндолиновых генов мягкой пшеницы / [С. В. Чеботар, К. О. Куракіна, О. М. Хохлов та ін.]. // *Цитология и генетика*. – 2012. – №4. – С. 9–18.
112. Variety protection and plant breeders rights in the 'DNA Era' / H. Jones, C. Norris, J. Cockram, D. Lee. // *Diagnostics in Plant Breeding*. – 2013. – V.15. – P. 369–402.
113. Чеботар С. В. Молекулярно-генетичний поліморфізм українських сортів озимої м'якої пшениці / С. В. Чеботар // *Збірник наукових праць*

- Селекційно-генетичного інституту Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення. – 2011. – Вип. 17 (57). – С. 17–29.
114. Чеботарь С. В. Анализ распределения аллелей микросателлитных локусов у сортов мягких пшениц Селекционно-генетического института на различных этапах селекции с 1912 по 2002 гг. / С. В. Чеботарь // Сборник тезисов IV Международной конференции «Геном растений» (10-13 июня 2003), Одесса. – 2003. – С. 35–40.
 115. Пат. на корисну модель №19828 Україна, (51) МПК (2006) C12Q 1/28, G01N27/26, G01 N 33/53. Спосіб визначення новизни сортів та ліній м'якої пшениці за ДНК-типуванням / Чеботар С. В., Сиволап Ю.М.. Пат. 19828; Заявл. 02.03.2004; Опубл. 15.01.2007; Бюл. № 1. - 4 с.
 116. National Diet and Nutrition Survey: Results from Years 1, 2, 3 and 4 (combined) of the Rolling Programme (2008/2009 – 2011/2012) Executive summary [Електронний ресурс] // Public Health England. – 2017. – Режим доступу до ресурсу: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/594360/NDNS_Y1_to_4_UK_report_executive_summary_revised_February_2017.pdf.
 117. World health statistics 2015 [Електронний ресурс] // World Health Organization. – 2015. – Режим доступу до ресурсу: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/170250/9789240694439_eng.pdf;jsessionid=40C40B01F3800EA8234790A45E25323C?sequence=1
 118. Тарасюк О. І. Вміст у листках азоту та продуктивність ліній озимої м'якої пшениці, унікальних за хлібопекарськими властивостями. / О. І. Тарасюк, В. М. Починок. // Физиология растений и генетика. – 2015. – №1. – С. 66–73.
 119. Атабаева Х. Н. Биология зерновых культур / Х. Н. Атабаева, И. В. Массино. - Гос. науч. изд. «Узбекистон миллий энциклопедияси» Ташкент, 2005. – 204 с.

120. Kasarda D. D. Wheat proteins / D. D. Kasarda, J. E. Bernardin, C.C. Nimmo.- Advances in Cereal Science and Technology. A.A.C.C., St. Paul, Minnesota, USA, 1976. – V.158. – 236 p.
121. Simmonds N. The relation between yield and protein in cereal grain // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 1995. – V. 67. – P. 309–315.
122. Церлинг В. В. Диагностика питания сельскохозяйственных культур: Справочник / В. В. Церлинг. – М. : Агропромиздат, 1990. – 235 с.
123. Совриков А. Б. Влияние содержания микроэлементов в почве на урожайность зерна яровой пшеницы в условиях умереннозасушливой и колючей степи Алтайского края / А. Б. Совриков, В. Г. Бахарев. // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. – №81. – С. 12–15.
124. Mapping gene(s) for grain protein in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) using a population of recombinant inbred chromosome lines / [L. R. Joppa, C. Du, G. E. Hart et al.]. // Crop Science. – 1996. – V.37. – P. 1586–1589.
125. Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat / [G. Velu, I. Ortiz-Monasterio, I. Cakmak et al.]. // Journal of Cereal Science. – 2014. – V.59. – P. 365–372.
126. Transfer of useful variability of high grain iron and zinc from *Aegilops kotschy* into wheat through seed irradiation approach. / [S. K. Verma, S. Kumar, I. Sheikh et al.]. // International Journal of Radiation Biology. – 2016. – V.92. – P. 132–139.
127. Precise mapping of a locus affecting grain protein content in durum wheat. / [S. Olmos, A. Distelfeld, O. Chicaiza et al.]. // Theoretical and Applied Genetics. – 2003. – V.107. – P. 1243–1251.
128. Strong presence of the high grain protein content allele of NAM-B1 in Fennoscandian wheat / [J. Hagenblad, L. Asplund, F. Balfourier et al.]. // Theoretical and Applied Genetics. – 2012. – V.125. – P. 1677–1686.
129. Uauy C. The high grain protein content gene *Gpc-B1* accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat. / C. Uauy, J. C. Brevis,

- J. Dubcovsky. // Journal of Experimental Botany. – 2006. – V.57. – P. 2785–2794.
130. Cantrell R. G. Genetic analysis of quantitative traits in wild emmer (*Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides*) / R. G. Cantrell, L. R. Joppa. // Crop Science. – 1991. – V.31. – P. 645–649.
 131. Identification and functional characterization of a rice *NAC* gene involved in the regulation of leaf senescence / [Y. Zhou, W. Huang, L. Liu et al.]. // BMC Plant Biology. – 2013. – V.13. – P. 1–13.
 132. Functional characterization of *GPC-1* genes in hexaploid wheat. / [R. Avni, R. Zhao, S. Pearce et al.]. // Planta. – 2014. – V.239. – P. 313–324.
 133. Regulation of Zn and Fe transporters by the *GPC1* gene during early wheat monocarpic senescence. / [S. Pearce, F. Tabbita, D. Cantu et al.]. // BMC Plant Biology. – 2014. – V.14. – P. 1–23.
 134. Effects of the *Gpc-B1* locus on high grain protein content introgressed into Argentinean wheat germplasm / [F. Tabbita, S. Lewis, J. Vouilloz et al.]. // Plant Breeding. – 2013. – V.132. – P. 48–52.
 135. Swedish spring wheat varieties with the rare high grain protein allele of *NAM-B1* differ in leaf senescence and grain mineral content. / [L. Asplund, G. Bergkvist, M. W. Leino et al.]. // PLoS one. – 2013. – V.8. – P. 1–11.
 136. Tabbita F. Breeding for increased grain protein and micronutrient content in wheat: Ten years of the *GPC-B1* gene / F. Tabbita, S. Pearce, A. Barneix. // Journal of Cereal Science. – 2017. – V.73. – P. 183–191.
 137. Carter A. Assessment of the effects of the *Gpc-B1* allele on senescence rate, grain protein concentration and mineral content in hard red spring wheat (*Triticum aestivum* L.) from the Pacific Northwest Region of the USA / A. Carter, D. Santra, K. Kidwell. // Plant Breeding. – 2012. – V.131. – P. 62–68.
 138. Wheat grain filling is limited by grain filling capacity rather than the duration of flag leaf photosynthesis: a case study using NAM RNAi plants / P. Borrill, B. Fahy, A. M. Smith, C. Uauy. // PLoS one. – 2015. – V.10. – P. 1–14.

139. Effect of the grain protein content locus *Gpc-B1* on bread and pasta quality / J. C. Brevis, C. F. Morris, F. Manthey, J. Dubcovsky. // Journal of Cereal Science. – 2010. – V.51. – P. 357–365.
140. Juhasz A. Wheat proteins. / A. Juhasz, F. Bekes, C. Wrigley // Applied Food Protein Chemistry, / Z. Ustunol. – United Kingdom: Wiley Online Library, 2015. – P. 219–305.
141. Brevis J. C. Effects of the Chromosome Region Including the Gpc-B1 Locus on Wheat Grain and Protein Yield / J. C. Brevis, J. Dubcovsky. // Crop Science. – 2010. – V.50. – P. 93–104.
142. Introgression of a major gene for high grain protein content in some Indian bread wheat cultivars / [J. Kumar, V. Jaiswal, A. Kumar et al.]. // Field Crops Research. – 2011. – V.123. – P. 226–233.
143. Introgression of the high grain protein gene Gpc-B1 in an elite wheat variety of Indo-Gangetic Plains through marker assisted backcross breeding/ [M. K. Vishwakarma, V. K. Mishra, P. K. Gupta et al.]. // Current Plant Biology. – 2014. – V.1. – P. 60–67.
144. Каталог сортів та гібридів [Електронний ресурс] / [О. В. Бушулян, А. О. Бєлоусов, Б. Ф. Вареник, та ін.] // Одеса. – 2017. – Режим доступу до ресурсу: http://www.sgi.in.ua/images/Vidanna_instituty/katalog_sortiv/katalog_SGI2017.pdf.
145. Державний реєстер сортів рослин придатних для поширення в Україні на 2018 рік [Електронний ресурс] // Київ. – 2018. – Режим доступу до ресурсу: <http://minagro.gov.ua/system/files/2006.03.2018.pdf>.
146. Development of PCR-based markers for a high grain protein content gene from ssp. transferred to bread wheat / [I. A. Khan, J. D. Procnier, G. D. Humphreys et al.]. // Crop Science. – 2000. – V.40. – P. 518–524.
147. Physical map of the wheat high-grain protein content gene *Gpc-B1* and development of a high-throughput molecular marker. / A. Distelfeld, C. Uauy, T. Fahima, J. Dubcovsky. // New Phytologist. – 2006. – V.169. – P. 753–763.

148. Development of PCR markers for *Tamyb10* related to R-1, red grain color gene in wheat. / E. Himi, M. Maekawa, H. Miura, K. Noda. // Theoretical and Applied Genetics. – 2011. – V.122. – P. 1561–1576.
149. Expression of the novel wheat gene TM20 confers enhanced cadmium tolerance to bakers' yeast. / [Y. Kim, D. Kim, D. Shim et al.]. // Journal Biological Chemistry. – 2008. – V.283. – P. 15893–15902.
150. A Microsatellite Map of Wheat / [M. S. Röder, V. Korzun, K. Wendehake et al.]. // Genetics. – 1998. – V.149. – P. 2007–2023.
151. Dissemination of the highly expressed Bx7 glutenin subunit (Glu-B1a1 allele) in wheat as revealed by novel PCR markers and RP-HPLC. / [B. J. Butow, K. R. Gale, J. Ikea et al.]. // Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – V.109. – P. 1525–1535.
152. Liu S. New DNA markers for high molecular weight glutenin subunits in wheat. / S. Liu, S. Chao, J. A. Anderson. // Theoretical and Applied Genetics. – 2008. – V.118. – P. 177–183.
153. Triticum aestivum puroindolines, two basic cystine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. / [M. F. Gautier, M. E. Aleman, A. Guirao et al.]. // Plant Molecular Biology. – 1994. – V.25. – P. 43-57.
154. Stewart C. N. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications / C. N. Stewart, L. E. Via // Bio Techniques. – 1993. – V. 14. – P. 748-749.
155. Multistep-touchdown vectorette-PCR-a rapid technique for the identification of IVS in genes / [C. Rubie, E. Schulze-Bahr, H. Wedekind et al.] // Biotechniques. – 1999. – V. 27. – P. 414-418.
156. Brody J. R. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. / J. R. Brody, S. E. Kern. // Biotechniques. – 2005. – V.38. – P. 214–216.
157. Пат. № 17023 Україна, (2006) A01H 1/04. Спосіб непрямой оцінки «сили» борошна – седиментація SDS-30 / О. І. Рибалка, М. В.Червоніс, М. Г.

- Парфентьев, Д. В. Аксельруд; патентообладатель Селекційно-генетичний інститут. – №u200610062; заявл. 06.02.2006; опубл. 15.09.2006; Бюл. №9. – 6 с.
158. Нецветаев В. П. Руководство по генетическому анализу растений / В. П. Нецветаев. – Белгород: БелГУ, 2008. – 36 с.
159. Bauer D. F. Constructing confidence sets using rank statistics / D. F. Bauer. // Journal of the American Statistical Association. – 1972. – V.67. – P. 687–690.
160. Hollander M. Nonparametric statistical methods / M. Hollander, D. A. Wolfe // John Wiley & Sons. – 1973. – P. 115–120.
161. Student. The probable error of a mean. [Електронний ресурс] // Biometrika.. – 1908. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.york.ac.uk/depts/maths/histstat/student.pdf>.
162. Тищенко В. Н. Селекция и генетика пшеницы: Генетика пшеницы / В. Н. Тищенко, Н. М. Чекалин, М. Е. Баташова // Селекция и генетика отдельных культур / В. Н. Тищенко, Н. М. Чекалин, М. Е. Баташова. – Полтава: Друк книга, 2008. – С. 82–104.
163. Tautz D. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. / D. Tautz, M. Trick, G. A. Dover. // Nature. – 1986. – V. 322. – P. 652–656.
164. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. / [F. C. Buchanan, L. J. Adams, R. P. Littlejohn et al.]. // Genomics. – 1994. – V.22. – P. 397–403.
165. Дослідження генотипів пшениці м'якої з перенесеним геном *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* / [С. Ю. Похилько, А. В. Трояновська, А. І. Степаненко та ін.]. // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць.. – 2016. – №2016. – С. 132–136.
166. Ларченко К. А. Ознаки якості зерна пшениці та методи їх поліпшення / К. А. Ларченко, Б. В. Моргун. // Физиология и биохимия культурных растений. – 2010. – №42. – С. 463–474.
167. Yasmeen F. Genetic divergence for high-molecular weight glutenin subunits (*HMW-GS*) in indigenous landraces and commercial cultivars of bread wheat

- of Pakistan. / F. Yasmeen, H. Khurshid, A. Ghafoor. // Genetics and Molecular Research. – 2015. – V.14. – P. 4829–4839.
168. Атабаєва Х. Н. Биология зерновых культур / Х. Н. Атабаєва, И. В. Массино. – Ташкент: «Узбекистон миллий энциклопедияси», 2005. – 204 с.
169. Payne P. I. Control by homoeologous group 1 chromosomes of the high-molecular-weight subunits of glutenin, a major protein of wheat endosperm. / P. I. Payne, C. N. Law, E. E. Mudd. // Theoretical and Applied Genetics. – 1980. – V.58. – P. 113–120.
170. Payne P. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality // Annual Review of Plant Biology. – 1987. – V. 38. – P. 141–153.
171. Correlations between the inheritance of certain high-molecular weight subunits of glutenin and bread-making quality in progenies of six crosses of bread wheat / P. I. Payne, K. G. Corfield, L. M. Holt, J. A. Blackman. // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 1981. – V.32. – P. 51–60.
172. Рибалка О. І. Новітні генетичні аспекти поліпшення якості пшениці / О. І. Рибалка, М. А. Литвиненко. // Вісник аграрної науки. – 2009. – №4. – С.35–39.
173. Селекція і насінництво сільськогосподарських рослин / М. Я. Молоцький, С. П. Васильківський, В. І. Князюк, В. А. Власенко. – Київ: Вища освіта, 2006. – 463 с.
174. Жемела Г. П. Вплив сортових властивостей на продуктивність та якість зерна пшениці м'якої озимої / Г. П. Жемела, О. А. Кузнецова. // ВІСНИК Полтавської державної аграрної академії. – 2012. – №3. – С. 23–25.
175. Целуйко О. А. Зависимость массы 1000 зерен сельскохозяйственных культур от удобрений / О. А. Целуйко, В. И. Медведева. // Агрономия и лесное хозяйство. – 2014. – №2. – С. 58–60.
176. Похилько С. Ю. Аналіз білкових фракцій озимої пшениці носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* // Похилько С. Ю., Моргун

- Б. В., Степаненко А. І., Дуган О. М.: Матеріали І міжнародної науково-практичної інтернет конференції «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації», 14-15 грудня 2016 р. – Київ, 2016. – 432 с.
177. Починок В. М. Сучасний стан досліджень запасних білків пшениці / В. М. Починок, О. М. Радченко // Физиология и биохимия культ. растений. – 2011. – Т.43. – С. 255-266.
 178. Payne P. J. Catalogue of alleles for the complex gene loci *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat / P. J. Payne, G. J. Lawrence // Cereal Res. Communic. – 1983. – V.11, № 1. – P. 29-34.
 179. Унікальні за хлібопекарською якістю зерна селекційні лінії пшениці з рідкісними алелями *Gli/Glu*-локусів / В. В. Моргун, О. І. Тарасюк, В. М. Починок, О. І. Рибалка. // Физиология растений и генетика. – 2014. – №46. – С. 302–309.
 180. Genotype Diversity of Puroindoline Genes (*Pina-D1* and *Pinb-D1*) in Bread Wheat Cultivars Developed in Iran and CIMMYT / M.Mohammadi, E. Mehrazar, A. Izadi-Darbandi, N. Goodarz. // Journal of Crop Improvement. – 2014. – V.27. – P. 361–375.
 181. Expression of wild-type *pinB* sequence in transgenic wheat complements a hard phenotype. / B. Beecher, A. Bettge, E. Smidansky, J. Giroux. // Theoretical and Applied Genetics. – 2002. – V.105. – P. 870–877.
 182. Puroindoline grain hardness alleles in CIMMYT bread wheat germplasm / [M. Lillemo, F. Chen, X. Xia et al.]. // Journal of Cereal Science. – 2006. – V.44. – P. 86–92.
 183. Matus-Cadiz M. A. Puroindoline allele diversity in Canadian and northern US hard spring wheat varieties differing in kernel hardness / M. A. Matus-Cadiz, C. J. Pozniak, P. J. Hucl. // Canadian Journal of Plant Science. – 2008. – V.88. – P. 873–883.
 184. Генетичне різноманіття пуринолінових генів серед ліній пшениці м'якої, носіїв Gpc-B1 від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* / [Б. В. Моргун,

- С. Ю. Похилько, В. М. Починок та ін.]. // Фізіологія рослин і генетика. – 2017. – №3. – С. 229–236.
185. Визначення алельного стану генів *Glu-1* в гібридних сім'ях, носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* / С. Ю. Похилько, А. І. Степаненко, О. М. Дуган, Б. В. Моргун. // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць.. – 2017. – Т.21. – С. 168–173.
 186. Barak S. Biochemical and Functional Properties of Wheat Gliadins: A Review / S. Barak, D. Mudgil, S. Khatkar. // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2014. – V.55. – P. 357–368.
 187. Micronutrient deficiencies in pregnancy worldwide: health effects and prevention. / [A. D. Gernand, K. J. Schulze, C. P. Stewart та ін.]. // Nature Reviews Endocrinology. – 2016. – №12. – С. 274–289.
 188. Geographical distribution of trace element problems / R. M. Welch, W. H. Allaway, W. A. House, J. Kubota // Micronutrients in Agriculture / R. M. Welch, W. H. Allaway, W. A. House, J. Kubota. – USA: Soil Science Society of America, 1991. – P. 31–57.
 189. Mapping gene(s) for grain protein in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) using a population of recombinant inbred chromosome lines / L. R. Joppa, C. Du, G. E. Hart, G. A. Hareland. // Crop Science. – 1996. – V.37. – P. 1586–1589.
 190. Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat / [G. Velu, I. Ortiz-Monasterio, I. Cakmak et al.]. // Journal of Cereal Science. – 2014. – V.59. – P. 365–372.
 191. Abbaspour N. Review on iron and its importance for human health. / N. Abbaspour, R. Hurrell, R. Kelishadi. // Journal of Research in Medical Sciences. – 2014. – V.19. – P. 164–174.
 192. Andrews N. C. Iron metabolism: iron deficiency and iron overload. / Andrews. // Annual Review of Genomics and Human Genetics. – 2000. – №1. – С. 75–98.

193. Oliveira F. Iron metabolism: from health to disease. / F. Oliveira, S. Rocha, R. Fernandes. // Journal of Clinical Laboratory Analysis. – 2014. – V.28. – P. 210–218.
194. Card S. The Micronutrient and Trace Element Status of Crops Grown on the Alberta Soil Quality Benchmark Sites [Електронний ресурс] / S. Card, J. Cathcart, J. Huang // AAFRD. – 2005. – Режим доступу до ресурсу: [http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/aesa10281/\\$file/final_plantmicro_report.pdf?OpenElement](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/aesa10281/$file/final_plantmicro_report.pdf?OpenElement).
195. Cabrera A. R. Zinc, aging, and immunosenescence: an overview / Á. R. Cabrera. // Pathobiol Aging Age Relat Dis. – 2015. – V.5. – P. 1–9.
196. Zinc and its importance for human health: An integrative review. / N. Roohani, R. Hurrell, R. Kelishadi, R. Schulin. // Journal of Research in Medical Sciences. – 2013. – V.18. – P. 144–157.
197. Elemental analysis of nutritional preparations by inductively coupled plasma mass and optical emission spectrometry. / A. Krejcova, I. Ludvíkova, T. Cernohorsky, M. Pouzar. // Food Chemistry. – 2012. – V.132. – P. 588–596.
198. Rayman M. P. Selenium and human health. / M. P. Rayman. // Lancet. – 2012. – V.379. – P. 1256–1268.
199. Preedy V. R. Selenium: Chemistry, Analysis, Function and Effects / V. R. Preedy. – United Kingdom: Royal Society of Chemistry, 2015. – 642 p.
200. ICP-MS analysis of bread wheat carrying the *Gpc-B1* gene of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* / [S. Y. Pokhylko, V. V. Schwartau, L. M. Mykhalska et al.]. // Biotechnologia acta. – 2016. – No.5. – С. 64–69.
201. Комплексний аналіз вмісту загального білка в зерні м'якої пшениці, яка містить ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* / [С. Ю. Похилько, В. В. Швартау, В. М. Починок та ін.]. // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2017. – №1. – С. 52–57.

Додатки

Акти впровадження результатів дисертаційних досліджень у селекційну роботу

ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ
РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
НАУК УКРАЇНИ



INSTITUTE OF PLANT
PHYSIOLOGY AND GENETICS
NATIONAL ACADEMY
OF SCIENCES OF UKRAINE

вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022
Тел./факс (38 044) 2575150, тел. (38 044) 2575160
E-mail: plant@ifrg.kiev.ua
Код ЄДРПОУ 05417242

31/17 Vasykivska Str., Kyiv, Ukraine, 03022
Tel./fax (38 044) 2575150, tel. (38 044) 2575160
E-mail: plant@ifrg.kiev.ua
State registry code 05417242

№ 106/177 "01" 04. 18/11.
На № _____ від _____

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЙНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Похилько Світлани Юріївни

«Технологічні аспекти біофортificaції м'якої пшениці геном
Gpc-B1 від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*»

Даним актом засвідчується, що розроблені системи молекулярно-генетичних ДНК-маркерів до гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* впроваджені у селекційну роботу Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Можливість контролю гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* у гібридах, популяціях і лініях дозволяє цілеспрямовано добирати цінний селекційний матеріал для створення нових сортів м'якої пшениці з підвищеним вмістом запасних білків, мікро- та макроелементів.

Директор Інституту фізіології
рослин і генетики НАН України
академік НАН України



[Handwritten signature]

В.В.Моргун

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ
АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ІНСТИТУТ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ЦЕНТР
НАСІННЄЗНАВСТВА ТА
СОРТОВИВЧЕННЯ



NATIONAL ACADEMY OF AGRICULTURAL
SCIENCES OF UKRAINE
PLANT BREEDING S GENETICS
INSTITUTE – NATIONAL CENTER OF
SEED AND CULTIVAR
INVESTIGATION

Овідіопольська дорога, 3, м. Одеса 65036
Тел. (048) 7895427 Факс: (048) 7895289
E-mail: sgi-uaan@ukr.net

Ovidiopolska doroga, 3, Odesa, 65036 Ukraine
Tel. (38-048) 7895427 Fax: (38-048) 7895289
E-mail: sgi-uaan@ukr.net

№ 85/108 від «28» 03 2018 р

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор СГІ-НЦС НААН України
член-кореспондент НААН України

В.М. Соколов
«28» 03 2018 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЙНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Похилько Світлани Юріївни

«Технологічні аспекти біофортифікації м'якої пшениці геном
Gpc-B1 від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*»

Даним актом засвідчується, що в експериментальній роботі відділу генетичних основ селекції Селекційно-генетичного інституту впроваджені і використовуються наступні розробки Похилько С.Ю., що виконані за її дисертаційними дослідженнями.

1. за допомогою розроблених Похилько С.Ю. маркерних систем до гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, була можливість контролю цільового гена та цілеспрямований відбір цінних гібридних ліній пшениці.
2. за допомогою розроблених Похилько С.Ю. маркерних систем до локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219* було проаналізовано гібридні лінії пшениці F_3 покоління носії гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Завідувач відділу генетичних основ
селекції СГІ НЦС НААН України
д.б.н., ст.н.с.

О.І. Рибалка
О.І. Рибалка

008452